

**VERSUCHE ZUR PROLIFERATIONS- UND
VOLUMENREGULATION DER HEPATOCYTEN
NACH EXPERIMENTELLER TEILHEPATEKTOMIE**

Jörg Tongendorff

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554604_0078

Max-Planck-Institut für Biochemie, München

Direktor: Prof. Dr. A. Butenandt

VERSUCHE ZUR PROLIFERATIONS- UND VOLUMENREGULATION
DER HEPATOCYTEN NACH EXPERIMENTELLER TEILHEPATEKTOMIE

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades in der Humanmedizin
verfaßt und der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Jörg Tongendorff

München 1973



1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Butenandt

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Mündliche Prüfung: 4. Dez. 1973

Die vorliegende Doktorarbeit wurde von September 1969 bis November 1971 am Max-Planck-Institut für Biochemie in München durchgeführt.

Herrn Professor Dr. A. Butenandt und Herrn Professor Dr. G. Ruhenstroth-Bauer danke ich für die vielseitige Förderung und Unterstützung der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	S. 1
II. Material und Methoden	S. 3
III. Ergebnisse	S. 24
IV. Besprechung	S. 35
V. Zusammenfassung	S. 62
VI. Literaturverzeichnis	S. 64

I.

Jeder eukaryonte Organismus besitzt die Fähigkeit, zerstörte oder verlorengegangene Teile durch Proliferation mindestens teilweise zu ersetzen (1).

Regeneration können subzelluläre Organellen ebenso wie Organe zeigen (2-4). Kompensatorisches Wachstum dient der Homöostase von Funktionen, die durch physiologische oder pathologische Prozesse gestört oder gefährdet sind; es findet sein Ende bei Wiedererreichen des funktionellen Gleichgewichtszustandes (5-7).

So kann der erwachsene Säugerorganismus Teile endo- und ektodermaler Gewebe mittels Zellproliferation ersetzen, wenn Restgewebe als Regenerationsbasis vorliegt. Es findet also keine Neubildung gänzlich entfernter oder zerstörter Organe statt.

An der Leber ist dieser Vorgang besonders intensiv studiert worden. Seit 1886 ist die Leberregeneration Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen: V. PODWYSSOZKI (10) beobachtete, daß Verluste von Leberteilen durch Zellteilungen im Restgewebe gedeckt werden.

PONFICK (11) entfernte 1889 bei Kaninchen wechselnd große Teile der Leber und konnte zeigen, daß an allen Stellen des Leberrestes mitotische Zellteilungen so lange auftraten, bis sich die Leber zu ihrem Ausgangsgewicht regeneriert hatte.

Kurze Zeit später begannen intensive Untersuchungen über die regenerierende Rattenleber nach Teilhepatektomie (12-14), um neben der Deskription der Vorgänge die Frage zu beantworten, welches die Faktoren sind, die das regenerative Geschehen auslösen und ihr Ausmaß bestimmen (15-17).

Als proliferationsauslösende und -regulierende Faktoren sind spezifische humorale Substanzen (8, 21, 33-44), die Wirkung von Hormonen (31), der Anstieg der Durchblutung im Restorgan (18, 27-30), die Erhöhung der Gallensekretion (19, 20) oder die Änderung der Plasma-

proteinverteilung (21-26) betrachtet worden.

Keine dieser Deutungen blieb ohne Widerspruch.

Bei der Analyse der Befunde kristallisieren sich drei Möglichkeiten der Regenerationsregulation heraus:

- a. Die intakte Leber baut ständig einen ihre Zellen mitose-stimulierenden Faktor ab, kann jedoch nach Gewebeverlust die Konzentration dieses Stoffes nicht mehr unter die kritische Konzentration senken (8, 32-44).
- b. Durch den Gewebeverlust bei der Teilhepatektomie sinkt die Konzentration eines normalerweise vorhandenen pro-liferationsinhibierenden Faktors ab, die Zellen können sich teilen (5, 21, 31, 45-52).
- c. Abweichend von a. und b. versucht JOHNSON (53) aufgrund mathematischer Überlegungen die Proliferationsregulation zu erklären: Nach Teilhepatektomie führt die erhöhte metabolische Beanspruchung der Einzelzelle zu einem kompensatorischen Wachstum, welches nach Überschreiten eines bestimmten "kritischen" Einzelzellvolumens (54) zur DNA-Synthese und schließlich zur Zellteilung führt, da nur so ein Verlust der intrazellulären Homöostase vermieden werden kann (55).

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, mittels Aufstellung von Volumenverteilungskurven vitaler Einzelhepatocyten zu verschiedenen Zeiten nach Teilhepatektomie die Hypothese vom "kritischen Volumen" zu prüfen und durch Anwendung einer neuen Methode den Einfluß humoraler Faktoren auf vitale Leberzellen zu bestimmen.

II. Material und Methoden

A. Materialien

Acridinorange	E. Merck AG, Darmstadt
Aether pro narcosi	Farbwerke Höchst
Alhydrex	Johnson u. Johnson, Hamburg
Altromin-Standardfutter	Altromin, Lage/ Lippe
Binotal	Bayer AG, Leverkusen
Catgut	W. Schwaner, Delmenhorst
Chloroform	E. Merck AG, Darmstadt
Collagenase, Clostridiopeptidase A, EC 3. 4. 4. 19	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Edisonite	Merz + Co, Frankfurt/M.
Hämalaun	E. Merck AG, Darmstadt
Hämatoxylin	E. Merck AG, Darmstadt
Hyaluronidase, Hyaluronate glycanohydrolase, EC 3. 2. 1. 35	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Latex-Partikel, Polystyrene-Divenyl-benzene	Particle-Information-Service, Los Altos/ Calif. (USA)
Merfen	Zyma-Blaes AG, München
Mersilene	Ethicon GmbH, Hamburg
Nobecutan-Spray	Bastian-Werke, München
O ₂ /CO ₂ - Gasgemisch	Linde AG, München
Siliconöl AK 350	Wacker-Chemie, München
Trypanblau	Fluka AG, Buchs (Schweiz)
KCl, NaCl, MgSO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , NaHCO ₃ , KH ₂ PO ₄ , MgCl ₂ ·6 H ₂ O, NaH ₂ PO ₄ , reinst	E. Merck AG, Darmstadt

B. Geräte

Blitzgerät	Impulsphysik, Hamburg
Christ-Minifuge	M. Christ, Osterode/ Harz
Diffusionskammern	Millipore Filter GmbH, Neu-Isenburg
Filtrationsgerät, SM 162 26	Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen

Fluoreszenz-Mikroskop, Standard Universal mit Quecksilberhöchststrahlbrenner HBO 200, Erregerfilter BG 3 und Aufsetzkamera	Carl Zeiss, Oberkochen
Kryotom	Südwestdeutsche Labor-Einrichtungen-Elektrotechnik GmbH, Mainz-Gonzenheim
Leitfähigkeitsmeßzelle	Philips, Eindhoven (Niederl.)
Micro-Hematokrit-Centrifuge	Hawksley Ltd., Lancing, Essex (England)
Osmometer	Knauer, Berlin
pH-Meter	Radiometer Copenhagen, Kopenhagen (Dänemark)
Planimeter, Type 30 115	Ott, Kempten/ Allg.
Schüttelinkubator	Köttermann, Hänigsen/ Lehrte
Waagen	E. Mettler, Zürich (Schweiz)
Widerstandsmeßgerät, GM 4249/01	Philips, Eindhoven (Niederl.)
Zellvolumenverteilungsmeßanlage	MPI-Biochemie, München

C. Lösungen

Puffer I: Modifiziert nach HANKS (56), Ca^{2+} - und Glukosefrei.

Stammlösung A:	NaCl	162,21 g
	KCl	8,00 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,00 g
	Aqua bidest.	ad 1,00 l
Stammlösung B:	NaHCO_3	7,00 g
	KH_2PO_4	1,80 g
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,60 g
	NaCl	3,25 g
	Aqua bidest.	ad 1,00 l
Gebrauchs-		
lösung :	Stammlösung A	57,00 ml
	Stammlösung B	57,00 ml
	Aqua bidest.	ad 1,00 l

Mit HCl auf pH 7,35 eingestellt;

Osmolarität: 300 (+ 5) mosm/l

Puffer II: Volumetrie-Puffer

NaCl	8,10 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,60 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	4,00 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,02 g
Aqua bidest. ad	1,00 l

Osmolarität: 300 (+ 5) mosm/l; mit HCl auf
pH 7,35 eingestellt und bei einem Saugdruck
von 0,3 kp/cm² entgast.

Enzymlösung: Collagenase 75 Mandl-Einheiten
Hyaluronidase 660 I.E.
Puffer I ad 1 ml

Vor Anwendung wurden die Puffer mit dem Sartorius-Membran-
Druckfilter partikelfrei filtriert.

D. Siliconisieren der Glaswaren

Die Glaswaren wurden 5 Std. in Chromschwefelsäure gereinigt,
anschließend 12 Std. gewässert. Nach zweimaligem Spülen mit
Aqua dest. und 2-stdg. Trocknen bei 170° wurden die Gläser mit
Siliconlösung (2 ml Siliconöl AK 350 + 98 ml Chloroform) ge-
füllt, nach 2 min. entleert und mit der Öffnung nach unten
zum Abtropfen etwa 15 min. auf Filterpapier gestellt. Ab-
schließend wurde der Siliconfilm bei 300° für 5 Std. einge-
brannt.

E. Reinigen der Geräte

Operationsgeräte wurden nach Vorsäuberung eine Stunde in
Edisonite-Lösung gelegt, alle übrigen Geräte und Glaswaren
wurden nach dem Auswaschen etwa 12 Std. in 1 %iger Alconox-
Lösung aufbewahrt. Nach 12-stündigem Spülen unter fließen-
dem Leitungswasser und zweimaligem Spülen mit Aqua dest.
wurden alle Geräte im Trockenschrank bei 200° getrocknet.

F. Sterilisierung der Operationsgeräte und -materialien
Operationsgeräte und -materialien wurden bei 134° während 30 min. im Autoklaven sterilisiert (57).

G. Tiergut

Als Versuchstiere dienten etwa 6 Wochen alte, weibliche BDE-Inzuchtratten (21. und 22. Generation) mit einem Gewicht zwischen 95 bis 103 g. Die Tiere wurden einzeln in sägemehlgestreuten Plastik Käfigen gehalten. Altromin-futter und Leitungswasser ad libitum.

Die exogenen Faktoren wie Luftfeuchtigkeit, -temperatur, Hell-Dunkel-Wechsel und Umgebung blieben während der Serie gleich (58).

H. Präparation vitaler Einzelhepatocyten

Es gelangte die Methode der enzymatischen Zellpräparation nach HOWARD et al. (59) modifiziert zur Anwendung:

In Äthernarkose wurden die Ratten nach medianem Hautschnitt und peritonealer Öffnung durch die Bauchaorta bis zum Atemstillstand entblutet und die Vena cava inf. nach der Einmündung der vv. hepaticae durchtrennt. Sofort anschließend wurde die Leber in situ durch die Portalvene mit 20 ml Enzymlösung gespült, der Bauchhöhle entnommen und vorsichtig in kubische Stücke von 1 bis 2 mm Kantenlänge geschnitten.

Die Leberstücke wurden in 250 ml Erlenmeyerkolben gegeben, die 30 ml Enzymlösung enthielten. Die Kolben wurden bei 37° in einer O₂/CO₂ - Atmosphäre (95 Vol.% / 5 Vol.%) für 70 min. unter konstantem Schütteln (120/min.) inkubiert. Nach Inkubationsende wurde der Kolbeninhalt durch eine vierfache Mullage gegossen, durch Nachspülen mit eiskaltem Puffer I auf ein Volumen von etwa 100 ml gebracht und zweimal durch ein Stahlsieb mit der Maschenweite 50 µ gefiltert, wodurch größere Zellaggregate zurückgehalten wurden.

Die Zellen wurden bei 20 x g während 15 min. zentrifugiert.

Der Überstand wurde mit einer Pipette abgesaugt, der Unterstand in 10 ml Puffer I resuspendiert und zweimal bei $10 \times g$ für 10 min. gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in 2 ml Puffer I aufgeschwemmt und lichtmikroskopisch auf Vitalität geprüft (s.I). Der Anteil vitaler Einzelhepatocyten betrug 90 - 95 %.

I. Vitalitätsprüfung

50 μ l der Leberzellsuspension wurden mit 10 μ l Trypanblaulösung versetzt (Endkonzentration 0,05 %): Agonale und avitale Zellen färben sich blau (60).

Zu 50 μ l Leberzellsuspension wurden 5 μ l Acridinorange-lösung gegeben (Endkonzentration 0,01 %): Geschädigte und tote Zellen zeigen im Fluoreszenzmikroskop Rotfluoreszenz, intakte fluoreszieren grün (61).

J. Herstellung und Füllung der Diffusionskammern

Es wurden Millipore-Filter, Type HA, durchschnittliche Porengröße 0,45 μ , mit MF-Cement No. 1 beiderseits auf Diffusionskammerringe (innerer Durchmesser 10 mm, äußerer Durchmesser 14 mm, Stärke 2 mm) geklebt; nach 15 min. Lufttrocknung der Klebestellen wurden die Kammern unter Wasser durch Einblasen von Luft auf Undichtigkeiten geprüft (62).

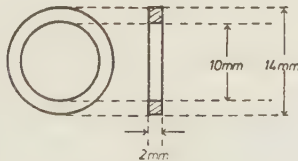


Abb. 1: Aufsicht und Kantenansicht einer Millipore-Kammer mit Abmessungen.

Die Sterilisation erfolgte fraktioniert: Nach 15 min. Kochen in Aqua bidest. lagerten die Kammern 12 Std. lang im Brutschrank bei 37°. Darauf wurden sie erneut für 15 min. in Aqua bidest. ausgekocht und abschließend bei 57° getrocknet.

Die Kammern wurden durch die Einfüllöffnung mit einer Kanüle Nr. 18 blasenfrei mit Hepatocytensuspension gefüllt, die Einfüllöffnung mit einem Kauter verschweißt und bis zur Implantation bei 4° in Binotal-versetztem und sauerstoffgesättigtem Puffer I aufbewahrt. Die Binotalkonzentration betrug 0,1 mg/ml.

K. Teilhepatektomie

Nach Rasieren und Merfen-Pinslung des Bauches wurden den Ratten in Äthernarkose nach medianem Hautschnitt und peritonealer Öffnung der vordere und der linke laterale Leberlappen nach Ligatur am Leberhilus abgetragen (63).

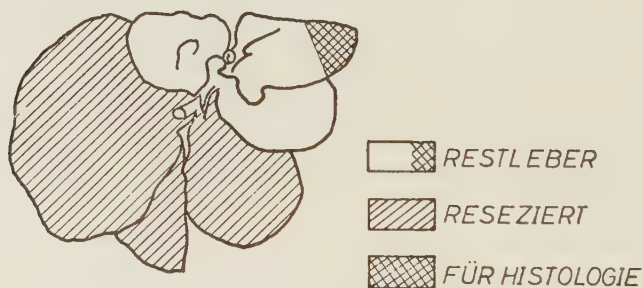


Abb. 2: Rattenleber; Ansicht von der visceralen Seite.

Da der Regenerationsimpuls direkt proportional der entfernten Lebermenge ist (64-67), wurde in Vorversuchen (n=10) das Ausmaß der Teilhepatektomie bestimmt: Die mittlere entfernte Menge betrug 65,2 ($\pm 1,9$) %.

Nach der Teilexcision erfolgte die Implantation von zwei mit Leberzellsuspension gefüllten Diffusionskammern in die Bauchhöhle.

Nach Gabe von 0,5 ml Binotal-Lösung (10 mg/ml) wurde die

Bauchhöhle in 2 Schichten verschlossen und die Operationsnaht mit Nobecutan-Spray besprüht.

Die Operation erfolgte unter aseptischen Bedingungen.

L. Schein-"Teilhepatektomie"

Um die Kontrollratten einer ähnlichen Operationsbelastung wie die der teilhepatektomierten Tiere auszusetzen, wurden sie einer Schein-"Teilhepatektomie" unterzogen, die sich von der Teilhepatektomie allein dadurch unterschied, daß keine Ligatur und Lappenentfernung, wohl aber Durchtrennung der Lig. falciforme und Lig. triangulare sin. erfolgte. Die Implantation der Diffusionskammern wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt.

Obwohl Ratten über eine allgemeine Resistenz gegen abdominelle Infektionen verfügen, erhielten sie dennoch postoperativ alle 6 Std. 25 mg Binotal/kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert, um möglichen infektiösen Einflüssen auf die Leberregeneration vorzubeugen.

M. Tötung der Versuchstiere - Entnahme der Diffusionskammern - Präparation der Leberzellen

Um den Einflüssen der Tagesperiodik (58, 68-71) zu entgegen, wurden diese Vorgänge jeweils zwischen 6⁰⁰ und 6¹⁵ durchgeführt. Es wurde, wie unter "Präparation vitaler Einzelhepatocyten" beschrieben, vorgegangen, nur wurden sofort nach Eröffnung der Bauchhöhle die Diffusionskammern entfernt und bevor die Perfusion der Leber erfolgte, eine Gewebeprobe aus dem Proc. caudalis zur Mitoseindexbestimmung entnommen.

Zur Bestimmung des Gewichtsanstieges der Restlebern in verschiedenen Intervallen nach Teilhepatektomie wurde analog vorgegangen. Ohne die Lebern zu perfundieren, wurden sie unmittelbar nach Atemstillstand entfernt und gewogen.

N. Präparation der Zellen aus den Diffusionskammern

Nach der Entnahme aus dem Abdomen wurden die Diffusionskammern ungeöffnet in 10 ml Enzymlösung gebracht und für 20 min. bei 37° in einer O₂/CO₂-Atmosphäre (95 Vol.% / 5 Vol.%) schüttelinkubiert, um außen anhaftende Bindegewebereste zu entfernen und um die an der Membraninnenseite haftenden Zellschichten zu lösen. Danach wurden die Kammern geöffnet und ihr Inhalt in 15 ml Enzymlösung für 40 min. inkubiert, wie unter II. H. beschrieben wurde. Abschließend wurden die Zellen durch ein Metallsieb (Maschenweite 50 µ) gefiltert und bei 10 x g während 10 min. zentrifugiert, der Überstand abgehoben und der Unterstand in 1 ml Puffer I resuspendiert.

Dieses Vorgehen hatte den Zweck, einerseits die während der Implantation reaggregierten Kammerzellen zu trennen und um andererseits diese Zellen einer der Zellseparation vergleichbaren mechanischen Beanspruchung auszusetzen. Bei der anschließenden Vitalitätsbestimmung konnten keine geschädigten, agonalen oder toten Zellen nachgewiesen werden.

O. Anfertigung histologischer Präparate

1. Lebergewebe

Die entnommene Lebergewebeprobe wurde im CO₂-Strahl eingefroren und nach etwa 4 Std. bei -22° im Kryotom geschnitten. Die 5 µ dicken Gewebeschnitte wurden nach CARNOY fixiert und die Zellkerne wahlweise mit MAYERS-Hämalaun oder mit Eisenhämatoxylin nach WEIGERT zur Darstellung gebracht (9).

2. Kammerzellen

Nach der Entfernung aus der Bauchhöhle wurden die Kammern durch Abtragen einer Membran geöffnet, ihr Inhalt in vorbereitete Gelatinetröge gegeben und im CO₂-Strahl eingefroren. Die anschließenden Schritte wurden analog zu 1. durchgeführt.

P. Bestimmung des Mitose-Index

Zur Bestimmung des Mitose-Index wurden von den histologischen Leber- und Kammerzellpräparaten 10 000 Parenchymzellen unter dem Mikroskop (40-fache Objektivergrößerung, 12-fache Okularvergrößerung) ausgezählt und der prozentuale Anteil der Mitosen bestimmt.

Wegen der wellenförmig von der Peripherie zum Zentrum der Lobuli hin ablaufenden Mitosewellen (73-75) wurde bei den Leberpräparaten darauf geachtet, daß die mikroskopierten Areale in lobulizentraler Richtung aneinander grenzten, um zufällige Überbewertungen einzelner Läppchenregionen zu vermeiden.

Q. Volumenbestimmung der Hepatocyten nach dem COULTER-Prinzip

1. Das COULTER-Verfahren

Die zu messenden Partikel werden in einer Elektrolytlösung suspendiert. Die Lösung stellt den Kontakt zwischen den am Ein- und Ausgang einer Kapillare liegenden Elektroden her, die mit einer stabilisierten Gleichstromquelle verbunden sind. Sobald ein Teilchen mit einem von dem der Lösung abweichenden spezifischen Widerstand in die Kapillare eintritt, kommt es zu einer kurzzeitigen Widerstandsänderung zwischen den Elektroden, welche unter bestimmten Bedingungen (s. 2.) proportional dem Volumen des Teilchens ist. Diese Impulse können gezählt und ihrer Höhe nach klassiert werden (76).

2. Prüfung des Verfahrens

Die Richtigkeit der mit dem Original-COULTER-Verfahren erhaltenen Volumenverteilungskurven wurde wiederholt in Frage gestellt (77-80), da COULTER-Messungen von Erythrocyten immer eine Rechtsschiefe ergaben, obgleich auf Grund anderer Meßverfahren eine normale GAUSS-Verteilung anzunehmen ist (81).

Dieser Sachverhalt konnte weitgehend geklärt werden (78-80, 82, 94):

Volumenverteilungskurven und Absolutvolumina können nur dann richtig gemessen werden, wenn

- a) der spezifische Widerstand der Partikel bestimmt ist und von dem des Suspensionsmediums stark abweicht,
 - b) die Form der Teilchen während des Kapillardurchlaufs bekannt ist,
 - c) die Partikel auf einer definierten Bahn durch die Kapillare gehen und Koinzidenzen vermieden oder herausgefiltert werden,
 - d) die Meßapparatur für die verwendete Kapillare geeignet ist.
- ad a) Der Durchgang eines Teilchens durch die Meßkapillare führt nur dann zu einem Volumen-proportionalen Impuls, wenn der spezifische Widerstand des Teilchens stark von dem des Meßmediums abweicht. Ist der spezifische Widerstand der Partikel kleiner als der des Mediums, so entstehen negative Impulse, ist er dagegen höher, so positive. Keine Impulse werden ausgelöst, wenn der spezifische Widerstand von Meßmedium und Partikeln gleich ist. Umgekehrt ist es möglich, durch Änderung des spezifischen Widerstandes des Meßmediums aus der Impulsart den spezifischen Widerstand der Partikel zu ermitteln und auf diese Weise die Anwendbarkeit des COULTER-Prinzips zu prüfen.

Zu diesem Zwecke wurden die Lebereinzelnzellen in isotonem Meßmedium von bekanntem spezifischen Widerstand suspendiert und die von ihnen nach dem COULTER-Verfahren erzeugten Impulse registriert. Als Meßmedium wurde isotone Sucroslösung verwandt, deren spezifischer Widerstand ($\rho = 3,02 \times 10^6 \text{ k}\Omega\text{cm}$) durch Zugabe von isotoner NaCl-Lösung nach Belieben gesenkt werden kann.

Der Durchmesser der Meßkapillare betrug 200μ , der Saugdruck $0,1 \text{ kp/cm}^2$, die Temperatur 4° .

Es zeigten sich bei allen Messungen, in denen der

spezifische Widerstand des Meßmediums kleiner als 10,2 k Ω cm war, positive, im Bereich über 14,6 k Ω cm eindeutig negative Impulse (Tab. 1).

ρ_{Medium} (k Ω cm)	Impuls	ρ_{Medium} (k Ω cm)	Impuls
6,1	+	11,6	<u>+</u>
7,3	+	11,7	<u>+</u>
8,7	+	14,6	<u>+</u>
9,2	+	14,6	-
9,8	+	17,5	-
10,2	<u>+</u>	20,4	-
10,5	<u>+</u>	24,0	-

Tab. 1: Die Abhängigkeit der von Hepatocyten ausgelösten Impulse vom spezifischen Widerstand des Suspensionsmediums.

Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß der spezifische Widerstand der Leberzellen größer ist als 9,8 k Ω cm und beweist, daß die Voraussetzung a) erfüllt wird.

- ad b) Gemäß der physikalischen Bedingungen geht ein von der Form des Partikels abhängiger Faktor in das Meßergebnis ein (86-88). Dieser Faktor beträgt bei sphärischen Partikeln 1,5 (89), bei ellipsoiden Teilchen nimmt er in Abhängigkeit zu den Achsenverhältnissen Werte zwischen 1,5 und 1,0 an (72). Zur Bestimmung des Formfaktors wurden die Leberzellen in der Meßkammer nach KACHEL (78) während des Kapillardurchlaufs photographiert (Abb.3), wobei sich zeigte, daß die Hepatocyten wegen der in der Kapillare wirkenden Strömungskräfte in Rotationsellipsoide (Verhältnis der kleinen zur großen Halbachse 1 : 1,19) verformt werden. Nach HURLEY (72) ist somit bei der Bestimmung des absoluten Volumens der Lebereinzelle ein Formfaktor von $F = 1,41$ in Rechnung zu stellen.

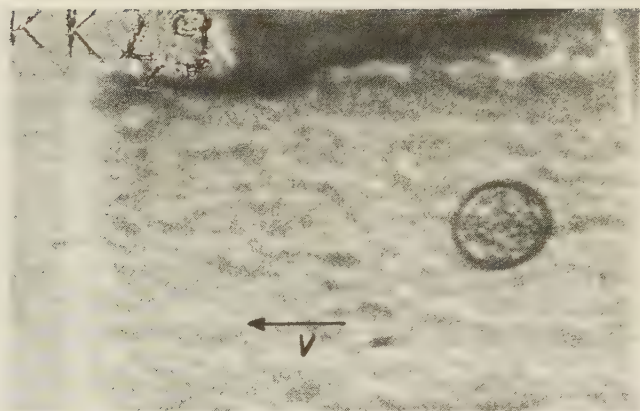


Abb. 3: Einzelhepatocyt während des Kapillardurchgangs.

ad c) Durch die Anwendung einer Partikelstrahlkapillare (78) konnten definierte Partikeldurchtrittsbahnen erzeugt werden, die eine unterschiedliche Bewertung der Teilchenvolumen vermeidet, wie sie bei undefinierten Bahnen durch Verzerrungen des elektrischen Feldes an den Kapillarkanten hervorgerufen wird (78,94).

Impulse von Koinzidenzen oder Randdurchgängen wurden durch das MPI-Klassiergerät IFK nach KACHEL (90) elektronisch unterdrückt.

ad d) Bedingt durch die Bandbreite des Verstärkers ist eine richtige Übertragung der Meßimpulse vom Lochwiderstand der Kapillare und vom Saugdruck, d.h. von der Geschwindigkeit, mit der die Teilchen die Kapillare durchlaufen, abhängig (93), d. h. von zwei Parametern, die mittelbar von den Abmessungen der Kapillare bestimmt werden. Weil zudem der Kapillarradius bei der Berechnung des Partikelvolumens in der 4. Potenz eingeht, wurde die vom Hersteller gemachte Angabe mit einem ZEISS UMM-Meßmikroskop nachgeprüft und der Kapillarradius in Übereinstimmung zum Hersteller mit $R = 100 \mu$ bestimmt. Während einer Meßreihe wurden bei wechselnden Saug-

drücken Volumenverteilungskurven einer Hepatocytenpräparation aufgenommen, wobei für Saugdrücke zwischen 0,05 und 0,3 kp/cm² eine Beeinflussung der Meßimpulse ausgeschlossen werden konnte. Die bisher zur Berechnung des elektronisch gemessenen Volumens angegebene Formel (92) nahm ein homogenes elektrisches Feld im Zentrum der Meßöffnung an; dies trifft bei den normalerweise verwendeten COULTER-Kapillaren nicht zu und führt zu einer rechnerischen Unterbewertung der Volumina (90). Dieser bisher unberücksichtigte Kapillarfaktor K ist für jede Kapillare spezifisch und kann durch einmalige Eichung mit Partikeln bekannter Größe bestimmt werden. Der Kapillarfaktor K der benutzten Kapillare wurde durch Vergleich des bekannten realen Volumens von 6 E-DVB-Polystyrene-Partikel $V_1 = 551 \mu^3$ mit dem nach GUTMANN (92) unter Berücksichtigung des Formfaktors F berechneten Volumens $V_2 = 457 \mu^3$ ermittelt und errechnete sich aus $V_1 : V_2$ zu $K = 1,21$.

Im Gegensatz zur einmaligen Kapillareichung muß das elektrische Meßsystem für jeden Meßvorgang nachgeeicht werden.

Dazu wurde der von GUTMANN (92) beschriebene Impulsgenerator verwandt, der die Impulse simuliert, wie sie beim Kapillardurchgang der Partikel entstehen; zudem berücksichtigte ein in Serie zum Generator geschalteter ohmscher Widerstand den Lochwiderstand der Kapillare (90). Die Impulshöhe, die durch 1 Ω Widerstandsänderung bei gegebener apparativer Einstellung gemessen wird, ist als Eichfaktor D definiert.

3. Aufbau der Meßapparatur

Meßstand nach dem COULTER-Prinzip mit Partikelstrahlkapillare (78), Kapillarlänge 126 μ , Kapillarradius 100 μ .

Feldeffekt-Halbleiter-Verstärker, $f_u = 30$ Hz, $f_o = 200$ kHz.

MPI-Impulshöhenklassiergerät IFK nach KACHEL (90).
UC-Klassieranlage (Rohde und Schwarz) mit Impuls-
meßzusatz, Drucker, Schreiber und Stanzer.

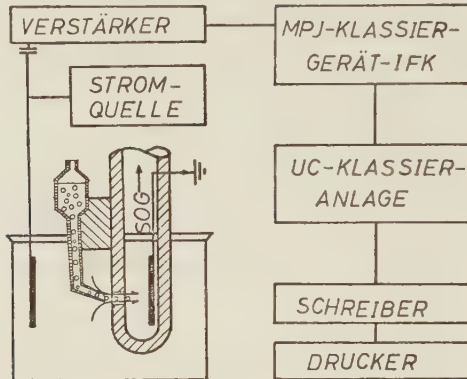


Abb. 4: Blockschaltbild der Meßapparatur

4. Durchführung der Messungen

Von der zu messenden Zellsuspension wurde eine Probe mit Puffer II soweit verdünnt, bis die Kapillardurchtrittsquote 200 - 300 Teilchen/sec. betrug. Gemessen wurde bei einem Saugdruck von $0,1 \text{ kp/cm}^2$, die Stromstärke der stabilisierten Gleichstromquelle betrug $0,31 \text{ mA}$, der Verstärkungsfaktor 2, die Klassenbreite $0,15 \text{ V}$.

5. Auswertung der elektronisch ermittelten Volumenverteilungskurven

Die Zellsuspensionen wurden während der Präparationsvorgänge (s. II. H.) so weit wie möglich von Zelltrümmern und Zellaggregaten gereinigt, doch konnten keine homogenen Hepatocytensuspensionen gewonnen werden. Deshalb stellen die von den Meßproben erhaltenen Volumenverteilungskurven nicht die Volumenverteilung der Einzelhepatocyten sondern die Summationskurven aus den Verteilungskurven der Zelltrümmer mit Nichtparenchymzellen, der Hepatocyten

und der reaggregierten Zellen dar (Abb. 5a). Zur Rekonstruktion der interessierenden Einzelhepatocytenkurve wurde wie folgt vorgegangen:

Im ersten Schritt konnten die Gesamtkurven im logarithmischen Papier für einen exponentiell abfallenden Hintergrund, welcher von den Zellbruchstücken und Nichtparenchymzellen gebildet wurde, korrigiert werden (Abb. 5b). Die so erhaltene Restkurve wurde dann in ein lineares Wahrscheinlichkeitspapier übertragen und deren Gipfelpunkte G_I und G_{II} markiert. Hierbei zeigte sich, daß nur die linke Flanke der korrigierten Verteilung bis G_I einer Gerade entspricht (Abb. 5c). In Übereinstimmung mit Untersuchungen, in denen von Mikroskopieaufnahmen der jeweiligen Zellsuspension die Durchmesser der Einzelzellen ($n = 300$) bestimmt und unter Zugrundelegung einer sphärischen Form in Volumen umgerechnet (s. II. Q. 2.b) in ein Volumen-Häufigkeits-Diagramm eingetragen wurden (s. Abb. 6), wobei sich die so erhaltenen Einzelhepatocytenverteilungskurven als normal-verteilt erwiesen, war es erlaubt, die linke Flanke bis G_I in G_I zu spiegeln und die Restverteilung, Population II, zu errechnen. Die Population II stellte die auch auf den Mikroskopieaufnahmen zu erkennende präparationsbedingte Mischverteilung aus reaggregierten Lebereinzelnzellen und Einzelzellen mit anhaftenden Zelltrümmern dar (Abb. 5d).

6. Berechnung des mittleren Hepatocytenvolumens

Das mittlere Einzelhepatocytenvolumen wurde nach der Formel

$$V = \frac{10 \cdot R^4 \cdot \bar{x} \cdot K}{D \cdot \rho \cdot F}$$

errechnet (92, 93).

Dabei bedeuten:

- | | |
|-----------|--|
| V | Partikelvolumen (μ^3) |
| R | Kapillarradius (μ) |
| $\bar{x}$ | mittlere Impulshöhe (V) als Mittelwert aller Einzelimpulse berechnet |
| K | Kapillarfaktor der verwendeten Kapillare |
| ρ | spezifischer Widerstand des Suspensionsmediums (Ωcm) |

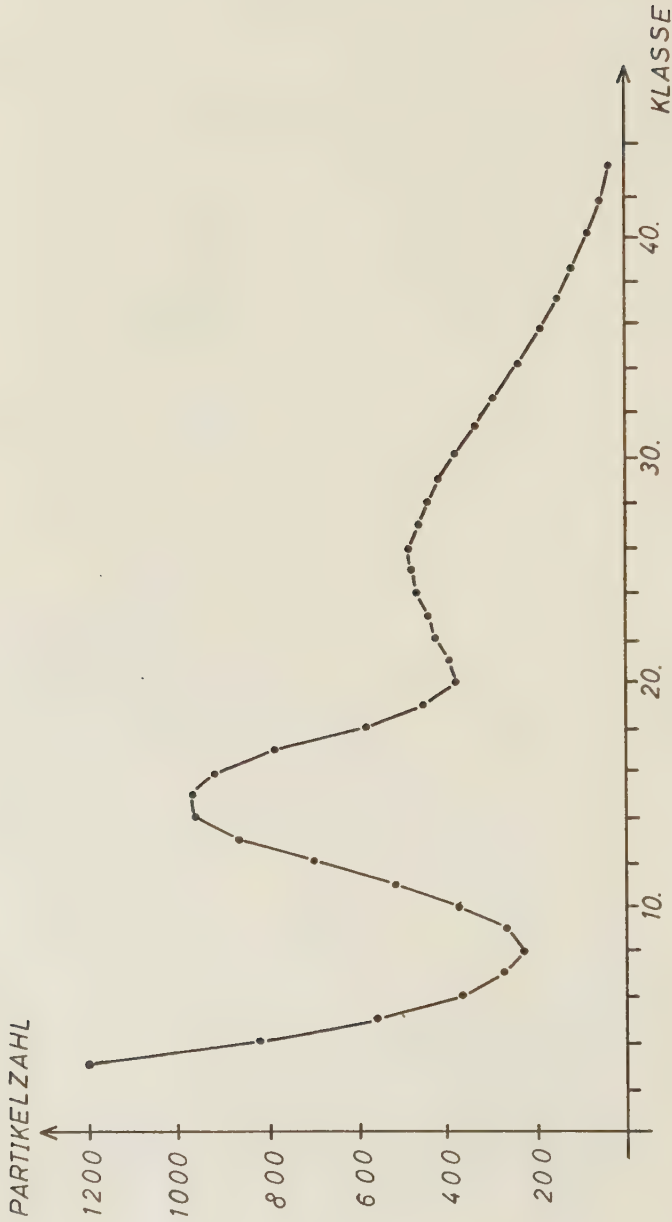


Abb. 5a: Elektronisch bestimmte Gesamtkurve der Volumenverteilungen der in den Meßproben suspendierten Zelltrümmer, Nichtparenchymzellen, Hepatocyten und reaggregierten Zellen.

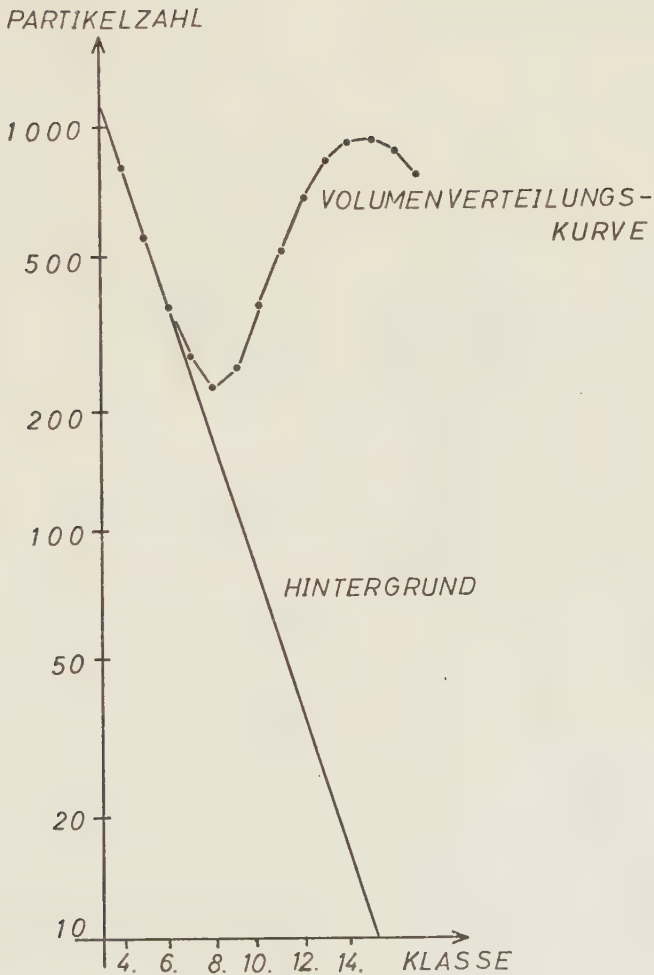


Abb. 5b: Überführung der elektronisch bestimmten Volumenverteilungskurve in logarithmisches Papier zur Korrektur des log. abfallenden Anteils der Zelltrümmer an der Gesamtkurve.

SUMMENHÄUFIGKEIT. [%]

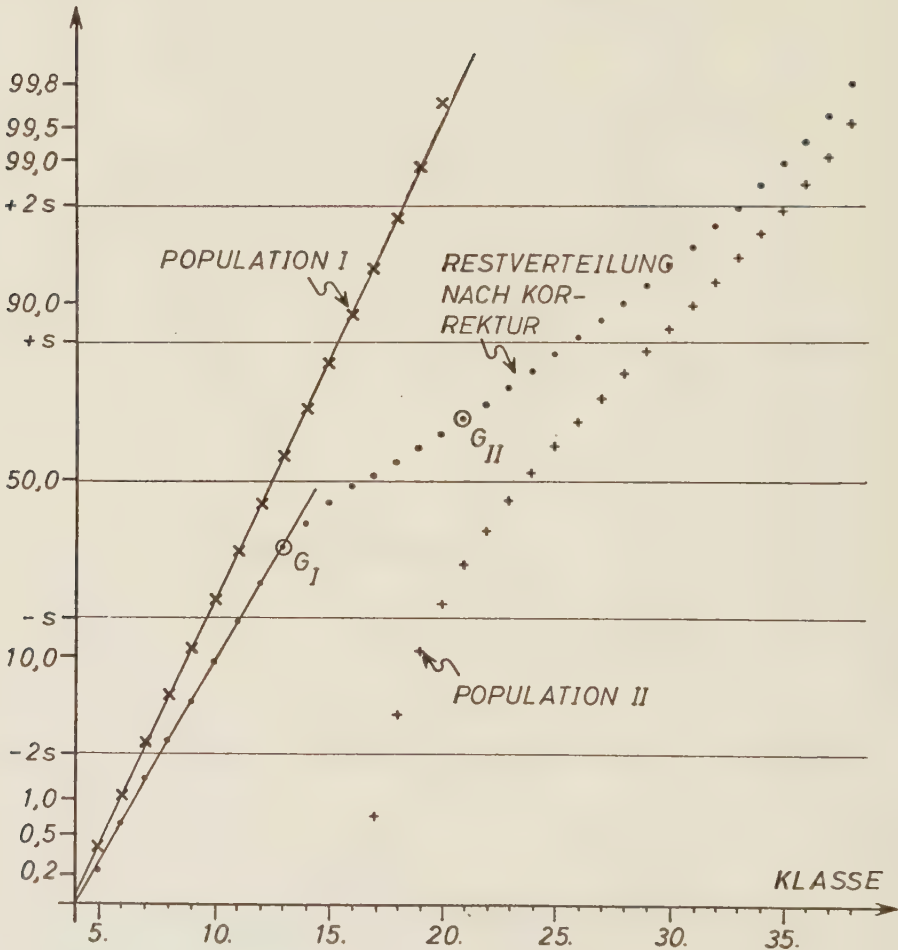


Abb. 5c: Übertragung der korrigierten Kurve in lineares Wahrscheinlichkeitspapier; Darstellung der Populationen I und II.
Näheres s. Text!

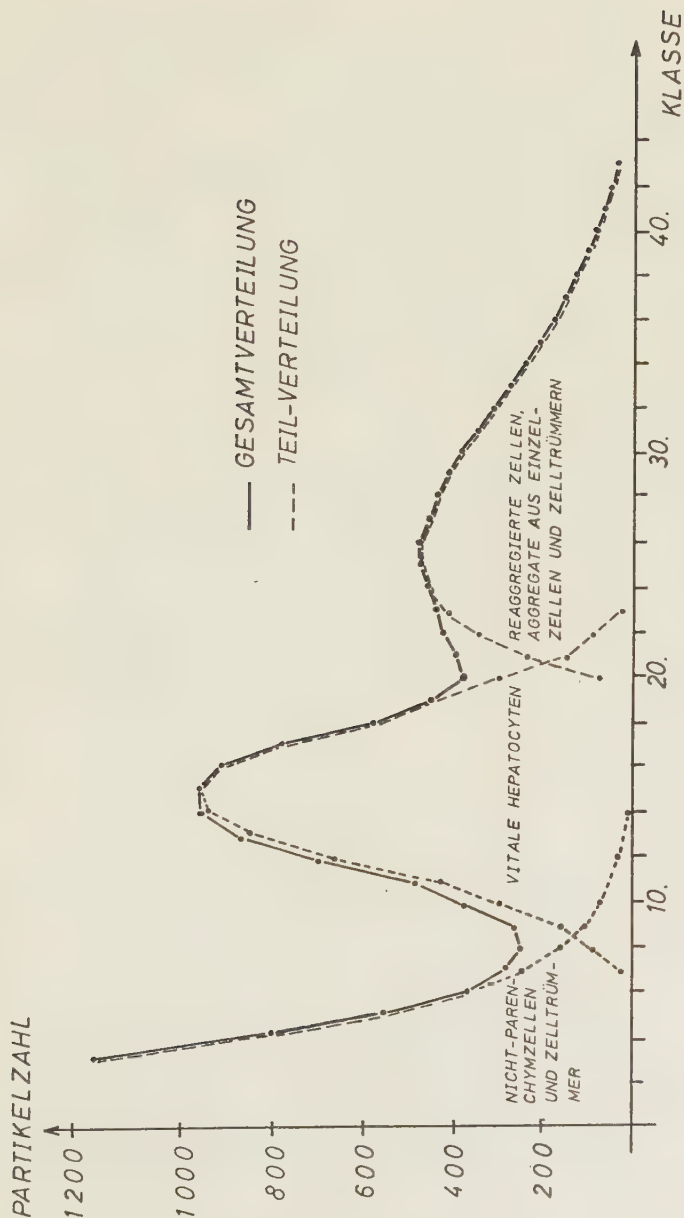


Abb. 5d : Zerlegung der Gesamtkurve in die Teilverteilungen.

D Eichfaktor (V / Ω)

F Formfaktor der gemessenen Partikel

7. Vergleich des elektronischen Verfahrens mit stereologischen Standardmethoden

Die Zuverlässigkeit der zur Ermittlung der Volumenverteilungskurven vitaler Einzelhepatocyten angewandten Methode wurde mit Kontrolluntersuchungen überprüft. So wurden von Mikroskopieaufnahmen der Zellpräparationen die Durchmesser der Projektionsflächen der Einzelhepatocyten bestimmt. Da diese Zellen während der mikroskopischen Aufnahme nicht jenen Saugdrücken ausgesetzt waren, welche sie bei der Kapillarpassage aus ihrer Kugelform in Rotationellipsoide verformen, war es erlaubt, von den Durchmessern ($n = 300$) Kugelvolumina zu errechnen und diese in ein Volumen-Häufigkeitsdiagramm einzutragen. Auf diese Weise ist es möglich, von den Präparationen die Art der Volumenverteilung, deren Mittelwerte und Variationskoeffizienten zu ermitteln, ohne dabei auf stereologisch gewonnene Absolutwerte angewiesen zu sein.

In Abbildung 6 wird an einem Beispiel gezeigt, daß diese Verteilungen mit den elektronisch-mathematisch aufgestellten gut übereinstimmen.

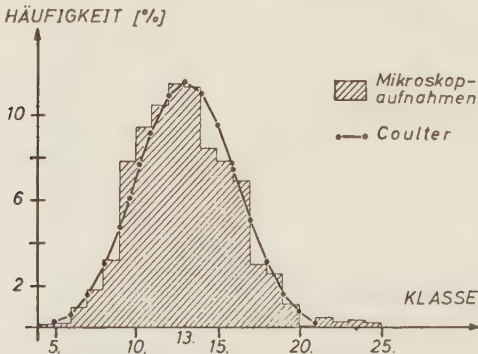


Abb. 6: Volumenverteilung einer Hepatocytenpräparation mit mikroskopischen bzw. elektronisch-mathematischen Verfahren ermittelt.

Eine weitere Überprüfung des elektronischen Verfahrens

ist durch die Bestimmung der relativen Zelldichte der histologischen Leberpräparate, die eine inverse Funktion des Zellvolumens ist, möglich.

Die Abbildung 7 bringt einen Vergleich der verschiedenartig ermittelten Relativvolumina der Hepatocyten nach Teilhepatektomie. Die Gleichartigkeit dieser Werte, die mit drei von einander unabhängigen Verfahren bestimmt wurden, beweist, daß die elektronisch-mathematische Methode zur Ermittlung der Volumenverteilungen von Einzelhepatocyten grundsätzlich zu gleichen Ergebnissen führt und bei viel geringerem Zeitaufwand die Messung eines weitaus größeren Stichprobenumfanges ermöglicht.

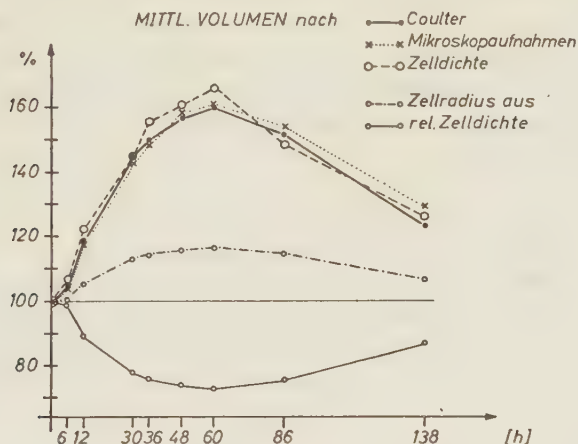


Abb. 7: Das Relativvolumen der Einzelhepatocyten nach Teilhepatektomie. Zu den Bestimmungsmethoden s. Text!

R. Bestimmung der Leberzelldichte

Zur Bestimmung der Leberzelldichte wurde in Analogie zu II. P. die Anzahl der Zellen je Blickfeld bestimmt. Von jedem Präparat wurden 10 000 Zellen ausgezählt.

III. Ergebnisse

Da die teilhepatektomierten und schein-"teilhepatektomierten" Ratten sich allein in der Leber-Teilexcision unterschieden und im übrigen gleichen Bedingungen ausgesetzt waren, ermöglicht der Vergleich der Ergebnisse den Einfluß der durch die Teilhepatektomie bewirkten Veränderungen zu beurteilen und diese mit den Werten von Normaltieren in Beziehung zu setzen.

A. Verhalten der Tiere

Die Überlebensrate der Versuchstiere betrug 100 % ; die Laparotomiewunden heilten primär. Die operationsbedingte Verminderung der Bewegungsaktivität war nach 24 Std. überwunden, das Verhalten der Tiere glich wieder dem der Normaltiere.

B. Körpergewicht

1. Normaltiere

Im Alter von 5 bis 9 Wochen, entsprechend 90 bis 160 g Körpergewicht, folgt die Gewichtszunahme der Normaltiere nahezu einer linearen Funktion (91):

$$G_t = g + t \cdot x$$

Dabei bedeuten:	G_t	Gewicht zur Zeit t	(g)
	g	aktuelles Gewicht	(g)
	t	Zeitvariable	(Tage)
	x	Zuwachsrate	(g / d)

Bei den verwendeten weiblichen BDE-Ratten betrug die tägliche Zuwachsrate $x = 3$ g.

2. Schein-"teilhepatektomierte" Ratten

Bei Operation betrug das mittlere Körpergewicht 98,7 ($s \pm 2,4$) g ($n = 18$).

In der Zeit zwischen Operation und 6 Std. p.o. nahm das Gewicht deutlich ab, stagnierte bis zu 86 Std. p.o. und folgte dann wieder der normalen Wachstumsfunktion

$G_t = g + t \cdot x$, wobei es in der 96. Std. p.o. zum Ausgangswert zurückkehrte.

Durch die Operationseinflüsse war die Gewichtszunahme der Tiere 96 Std. gegenüber Normaltieren verzögert (Abb. 8 a). Die prozentuale Abweichung des Körpergewichts (Istgewicht) zum Gewicht normaler Tiere (Sollgewicht) zeigt die Abbildung 8 b, aus der hervorgeht, daß das Istgewicht vom Sollgewicht zur 86. Std. p.o. am stärksten abweicht, sich diesem aber im weiteren Verlauf wieder asymptotisch nähert.

3. Teilhepatektomierte Tiere

Das mittlere Gewicht dieser Tiere ($n = 16$) belief sich unmittelbar vor der Operation auf $99,4 (s \pm 1,95)$ g. Die Gewichtsminderung durch 2/3-Teilhepatektomie betrug $3,1 (s \pm 0,1)$ g. Der sofort einsetzende, allmählich fortschreitende Gewichtsverlust, der von einer Gegenschwankung zwischen der 48. Std. und 86. Std. p.o. unterbrochen wurde, endete nach 86 Std. p.o., als die Tiere ihr Minimalgewicht erreicht hatten. Von der 86. Std. p.o. an stellte sich wieder die normale Zuwachsrate von 3 g/die ein. Nach 144 Std. p.o. erreichten die teilhepatektomierten Ratten ihr Ausgangsgewicht (Abb. 8 a).

Die Abweichung des tatsächlichen Gewichts (Istgewicht) vom Sollgewicht zeigt Abbildung 8 b.

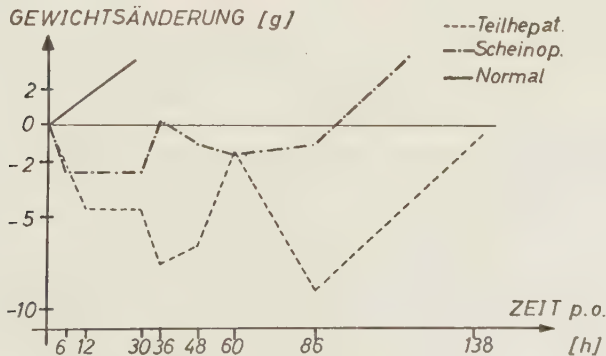


Abb. 8 a

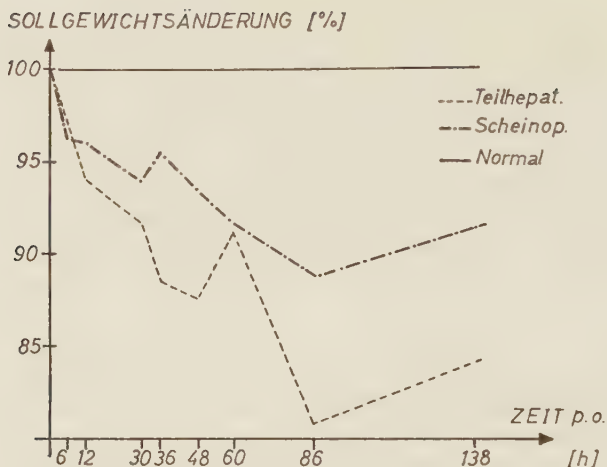


Abb. 8 b

Abb. 8 : Der Verlauf des Körpergewichts schein-"teilhepatektomierter" und teilhepatektomierter Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren. In Abb. 8 a werden die Angaben in g gemacht; die Abb. 8 b zeigt die prozentuale Abweichung des Istgewichts vom Sollgewicht.

C. Lebergewicht

1. Normaltiere

Das durchschnittliche Lebergewicht 100 g schwerer, weiblicher BDE-Ratten ($n = 10$) betrug $4,75$ ($s \pm 0,14$) g.

2. Teilhepatektomierte Ratten

Die Meßwerte sind aus 2 Versuchen je Zeitintervall bestimmt worden.

Der Gewichtsanstieg der Restleber nach Teilhepatektomie erfolgte stetig. Nach einer anfänglichen Verzögerungsphase zeigte die Restleber in dem Bereich zwischen der 6. Std. und der 138. Std. p.o. einen steilen Gewichtsanstieg, der sich jedoch nach 138 Std. p.o. abschwächte und sich im weiteren Verlauf asymptotisch dem Gewicht der Normalleber annäherte, welches nach etwa 260 Std. erreicht wurde (Tab.2,

Abb. 9).

Zeit p.o. (h)	Gewicht (g)	relat. Gew.	% d. Normal- leber
0	1,65	1,000	34,80
6	1,74	1,054	36,50
12	1,94	1,194	41,40
30	2,44	1,480	51,50
36	2,56	1,550	54,00
48	2,82	1,710	59,50
60	3,03	1,840	64,00
86	3,46	2,100	73,00
138	4,29	2,600	87,00

Tab. 2: Postoperatives Gewicht der teilresezierten Leber
in g, in Relativeinheiten und in % der Normalleber.

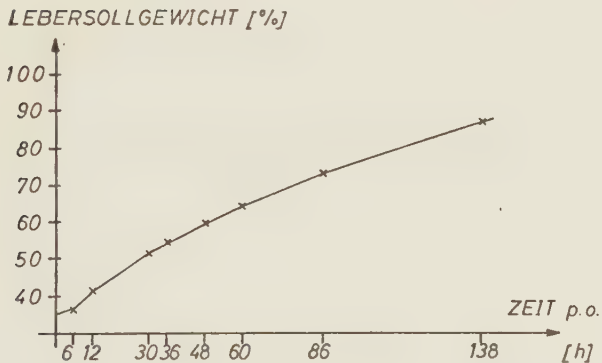


Abb. 9 : Gewichtszunahme der 2/3-resezierten Leber in
% des Normallebergewichts.

D. Volumenverteilung der Hepatocyten

1. Normaltiere

Von 16 Tieren mit einem mittleren Gewicht von 102 ($s \pm 2,75$)

g wurden die jeweiligen Volumenverteilungskurven der vitalen Einzelhepatocyten ($n \sim 9\,000$) aufgenommen. Die Volumen waren GAUSS-verteilt; der Mittelwert der Verteilungsmaxima lag bei $5353 (s \pm 1012) \mu^3$, der mittlere Fehler der Volumenmittelwerte betrug $208 \mu^3$; der Variationskoeffizient der einzelnen Verteilungen schwankte zwischen 18,7 und 19,1 %.

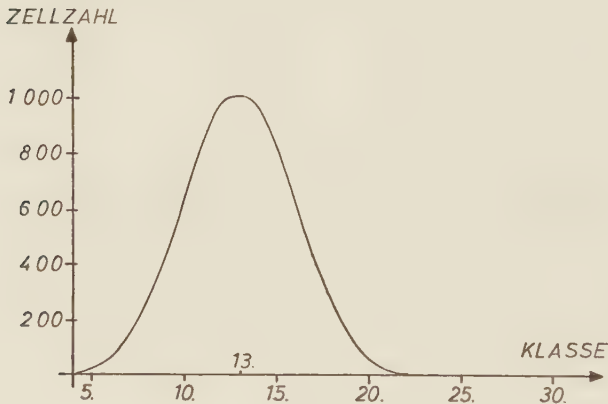


Abb. 10: Volumenverteilung der Einzelhepatocyten von Normalratten.

2. Schein-"teilhepatektomierte" Tiere

Die Angaben beziehen sich auf 4 Messungen von jeweils 2 Versuchen.

6 Std. nach der Operation haben sich die Leberzellen bei gleichem Variationskoeffizienten vergrößert; ihr Verteilungsmittelwert liegt bei $6353 (s \pm 1206) \mu^3$. In der Folgezeit gleichen sich die Volumenverteilungen wieder denen der Normaltiere an und bleiben ab der 12. Std. p.o. im Bereich des doppelten mittleren Fehlers ($416 \mu^3$), der für die Volumenmittelwerte normaler Hepatocyten errechnet wurde (Abb. 11).

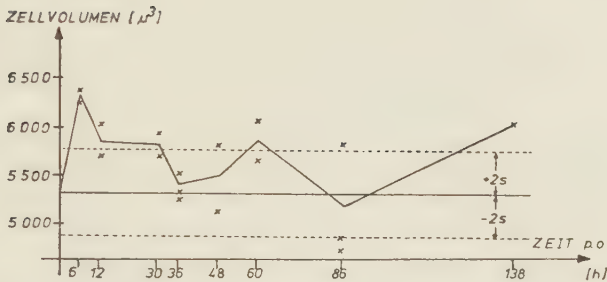


Abb. 11: Mittleres Hepatocytenvolumen nach Schein-"Teilhepatektomie".

3. Teilhepatektomierte Tiere

Die Werte sind errechnet aus 4 Messungen bei jeweils 2 Versuchen je Bestimmungspunkt. Die Maxima der GAUSS-förmigen Volumenverteilungskurven ($n \sim 10\,000$) stiegen nach der Teilhepatektomie von ausgangs $5353 (s \pm 1012) \mu^3$ bis zur 60. Std. p.o. rasch auf $8569 (s \pm 1622) \mu^3$ an und fielen dann allmählich wieder ab; sie lagen in der 138. Std. p.o. bei $6585 (s \pm 1245) \mu^3$. Während der beobachteten Regenerationszeit schwankte der Variationskoeffizient der GAUSSschen Volumenverteilungskurven zwischen 18,9 und 19,0 % (Abb. 12).

4. Kammerzellen von schein-"teilhepatektomierten" Tieren

Die Werte gründen sich auf jeweils 4 Messungen an 2 Tieren. Die Volumina der Einzelzellen waren GAUSS-verteilt. Bei einem durchschnittlichen Ausgangsvolumen von $5353 \mu^3$ sank das mittlere Volumen der Zellen ($n \sim 8\,000$) nach 6-stündiger Implantation auf $3928 (s \pm 710) \mu^3$, einem Variationskoeffizienten von 18,1 % entsprechend, und fiel nach 12 Std. zu einem Volumen von $1716 (s \pm 308) \mu^3$, Variationskoeffizient 18,0 %, ab. Alle späteren Messungen ergaben Werte, die nur geringfügig von dem 12-Stundenwert abwichen (Abb. 13).

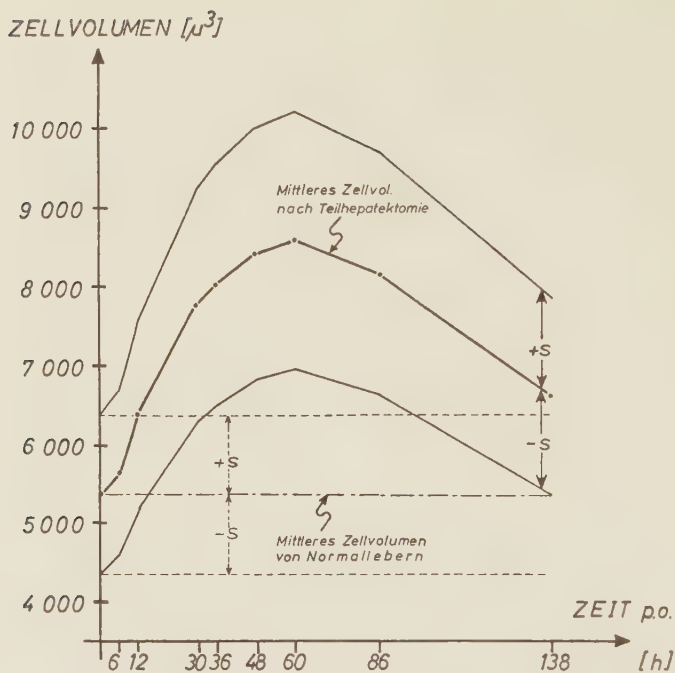


Abb. 12: Mittleres Hepatocytenvolumen nach Teilhepatektomie.

5. Kammerzellen von teilhepatektomierten Tieren

Für jeden Meßpunkt wurden 4 Messungen an je 2 Tieren durchgeführt.

Die Volumenverteilung der Zellen ($n \sim 8\,000$), die teilhepatektomierten Ratten implantiert waren, glich völlig der von Zellen, die schein-"teilhepatektomierten" Tieren eingepflanzt waren. Der Korrelationskoeffizient zwischen beiden Zellverteilungskurven betrug 0,98; die Abweichung vom Idealwert 1,0 bei kongruenten Kurven liegt innerhalb der Fehlergrenzen (Abb. 14).

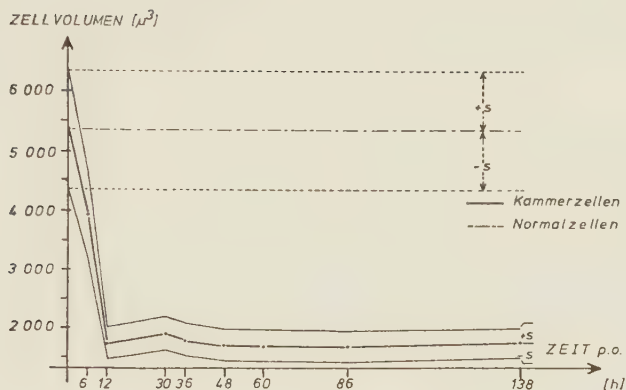


Abb. 13: Volumen der Kammerzellen nach Implantation.

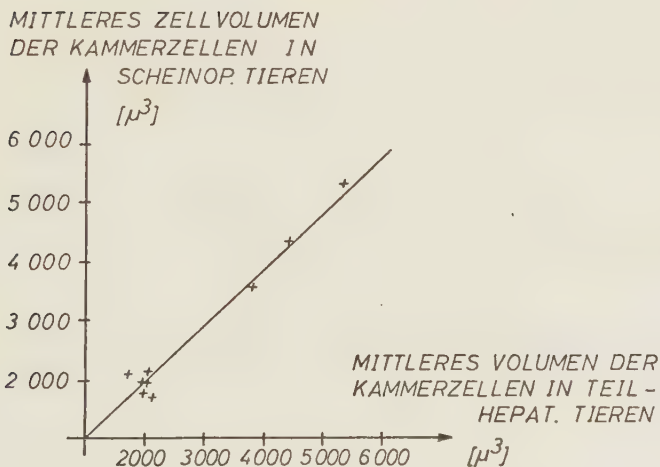


Abb. 14: Korrelation der Kammerzellvolumina von teil-hepatektomierten und schei-"teilhepatektomierten" Ratten zu jeweils gleichen Zeiten.

E. Leberzellendichte

1. Normaltiere

Bei 100 g schweren, unbehandelten Tieren ($n = 10$) wurden im Mittel 177,3 ($s \pm 9,1$) Zellen je Blickfeld gezählt.

2. Teilhepatektomierte Ratten

Je Meßpunkt wurden 2 Versuche durchgeführt.

Während sich in der 6. Std. p.o. die Zelldichte unwesentlich auf 176,0 Zellen/Blickfeld erniedrigte, sanken die Meßwerte für die 12. Std. p.o. auf 158,6 ($s \pm 6,9$) und erreichten ihr Minimum nach 60 Std. p.o. mit 129,5 ($s \pm 4,9$) Zellen/Feld. Im Anschluß nahm die Zelldichte wieder zu und betrug 138 Std. p.o. 153,9 ($s \pm 7,1$) Zellen/Blickfeld (Tab. 3, Abb. 15).

Zeit p.o. (h)	Zelldichte (Zellen/Feld)	relat. Zelldichte
0	177,3	1,000
6	176,0	0,993
12	158,6	0,895
30	138,2	0,779
36	135,3	0,763
48	131,2	0,740
60	129,5	0,730
86	134,0	0,756
138	153,9	0,868

Tab. 3: Zahl der Hepatocyten je Mikroskopblickfeld als Zelldichte ausgedrückt. Die Änderung der Zelldichte nach Teilhepatektomie.

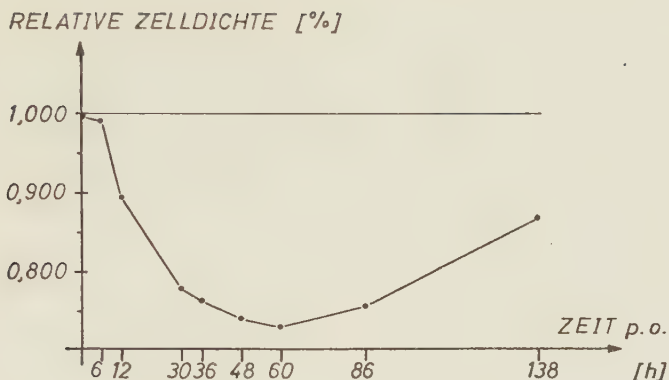


Abb. 15: Relative Zelldichte im Verlaufe der Leberregeneration.

F. Mitoseindices

1. Normaltiere

Der durchschnittliche Mitoseindex der Lebern unbehandelter, 100 g schwerer Ratten ($n = 10$) betrug $0,0176$ ($s \pm 0,0061$) % .

2. Schein-"teilhepatektomierte" Ratten

Die Untersuchung der Lebern zu verschiedenen Zeiten nach der Schein-"Teilhepatektomie" zeigte, daß die beschriebenen Manipulationen (s. II. L.) zu keiner Erhöhung des Mitoseindex führten (Abb. 16). Alle gefundenen Werte lagen innerhalb der 2s-Grenzen des Mitoseindex der Normallebern. Der mittlere Mitoseindex ($n = 8$) betrug $0,015$ ($s \pm 0,004$) % .

3. Teilhepatektomierte Ratten

Die Teilhepatektomie hatte nach 6 und 12 Std. p.o. keine Auswirkungen auf den Mitoseindex. Zur 30. Std. zeigten die Lebern einen steilen Mitosegipfel mit einem Mitoseindex von $5,68$ % , der von einem zweiten, schwächeren Gipfel zur 48. Std. p.o. bei einem Mitoseindex von $3,52$ % durch einen Mitoseabfall zur 36. Std. p.o., wo der Mitoseindex $2,42$ % betrug, getrennt wurde. Der Mitoseindex sank

im weiteren zeitlichen Verlauf stetig ab und betrug 138 Stunden nach Teilhepatektomie 0,0279 % (Abb. 16).

4. Kammerzellen von schein-"teilhepatektomierten" Tieren
Während in den ersten 30 Std. der Implantation keine Zellteilungen beobachtet werden konnten, betrug der Mitoseindex zur 36. Std. 0,027 %, stieg in der 48. Std. auf 0,39 % an und schwankte in der restlichen Untersuchungszeit geringgradig um diesen Wert (Abb. 16).

5. Kammerzellen von teilhepatektomierten Tieren
Das Teilungsverhalten der Zellen, welche teilhepatektomierten Ratten implantiert waren, glich völlig dem der in schein-"teilhepatektomierten" Ratten eingepflanzten Zellen (Abb. 16).

MITOSEINDEX [%]

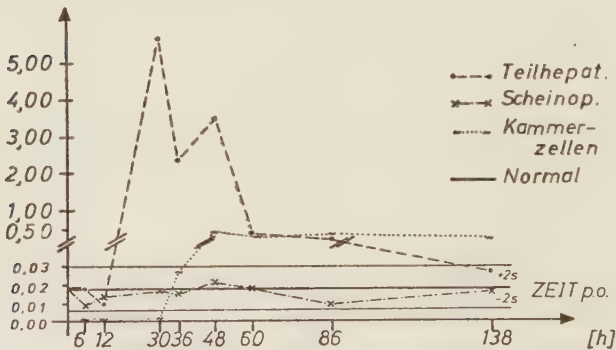


Abb. 16: Mitoseindizes der Rattenlebern von Normaltieren, schein-"teilhepatektomierten" und hepatektomierten Tieren sowie der Kammerzellen.

IV. Besprechung

Untersuchungen über die Regulation reparativer Wachstumsvorgänge werden bevorzugt an dem hochdifferenzierten Leberparenchym durchgeführt, da in diesem Gewebe die durch Zellverlust ausgelöste Regeneration weder an besondere Zonen gebunden ist, noch innergewebliche Differenzierungen - wie etwa in der Niere - besondere Bedingungen schaffen. Zudem bietet die Leber einen experimentellen Vorteil durch die leichte Zugänglichkeit bei der Laparotomie und - bei Verwendung von Ratten als Versuchstiere - die Möglichkeit, auf einfache Weise standardisierbare Gewebemengen entfernen zu können (97).

Um vergleich- und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde auf strenge Identität der Versuchsbedingungen geachtet; es wurden nur weibliche, gewichtslimitierte, spezifisch-pathogenfreie Ratten verwendet, die einer Inzucht entstammten, um so auch tierindividuelle Schwankungen zu begrenzen und um humorale Immunreaktionen bei homologen Heterotransplantationen auszuschalten.

Zum Körpergewicht

Das Körpergewicht ist als Resultante vieler, sich teilweise bedingender und in ihrem Zusammenwirken keineswegs restlos aufgeklärten Komponenten des gesamten Organismus ein verlässlicher Parameter, die Wirkung exogener und endogener Noxen und deren mögliche Kompensation zu verfolgen; es gibt Aufschluß über den Zustand des Gesamtorganismus.

Sowohl die teilhepatektomierten als auch die schein-"teilhepatektomierten" Tiere zeigten nach der Operation einen Abfall ihres Körpersollgewichts, wobei die Stärke durch die Operationsart zwar modifiziert wurde - die teilhepatektomierten Ratten erlitten einen größeren Gewichtsverlust -, der zeitliche Verlauf jedoch bei beiden Gruppen identisch

war.

Die unterschiedlichen Operationen lösten also die gleichen Reaktionen im Versuchstier aus, wodurch deutlich wird, daß die Operationsart keine spezifische Wirkung auf den Gesamtzustand der Tiere hatte und daß daher die Gegenüberstellung "teilhepatektomierte Ratte - schein-teilhepatektomierte Ratte" als Vergleich zwischen vergleichbaren Gruppen statthaft ist.

Zur Zellisolierungsmethode

Obwohl in-vivo-Untersuchungen der Proliferations- und Regenerationsregulation am Modell der Rattenleber nach 2/3-Teilresektion unentbehrlich sind, darf nicht übersehen werden, daß die an der komplexen Einheit "Ganztier" gewonnenen Ergebnisse keine Aussage darüber zulassen, welche besonderen Wechselwirkungen zwischen Gesamtorganismus und Organ "Leber", zwischen einzelnen Parenchymzellen selbst, zwischen Parenchym- und Mesenchymzellen und zwischen Parenchymzellen und Bindegewebe bestehen, die das Phänomen der Restitution auslösen und unterhalten. Zudem sind aus Untersuchungen am Gesamtorgan oder Organteilen eine morphometrische oder biochemische Charakterisierung des einzelnen Hepatocyten nur mit beträchtlicher Unsicherheit möglich.

Um eine genauere Beschreibung der am Organaufbau beteiligten Zellarten und ihrer Wechselwirkungen zu ermöglichen, wurden in den letzten zwei Jahrzehnten Methoden entwickelt, Leberzellen aus dem Organverband zu lösen, sie in Suspension zu halten oder in Kulturen zu propagieren.

Der Zusammenhalt der Leberzellen wird durch das Bindegewebe hergestellt. Leberbindegewebe besteht aus Glykosaminoglykan-Glucoproteid-Verbindungen und argyrophilen Fibrillen, einer Variante der kollagenen Fibrillen; es wird von Fibroblasten, Ductuluszellen und KUPFER-Sternzellen gebildet.

Eine Hepatocytenisolierung verlangt daher zuerst die ge-

zielte Zerstörung des Bindegewebes bevor anschließende Siebungs- und Zentrifugationsschritte die Isolierung der Parenchymzellen von Mesenchymzellen und Zelltrümmern herbeiführen.

Zur Aufhebung des Zellzusammenhangs sind zwei Prinzipien anwendbar. In einem Prinzip wird Ca^{2+} dem Bindegewebe, in dem es den Polymerisationsgrad bestimmt, durch Calcium-Komplexbildner entzogen, wodurch sich seine Festigkeit so weit vermindert, daß nunmehr geringe mechanische Kräfte genügen, die Zellen aus dem Organverband zu lösen, ohne sie dabei zwangsläufig zu zerstören.

Im zweiten Prinzip werden hydrolysierende Enzyme zum Abbau des Bindegewebes eingesetzt.

So kam Trypsin, welches sehr spezifisch Lysyl- und Arginylverbindungen spaltet, wegen seiner desintegrierenden Wirkung auf das Bindegewebe als erstes Enzym bei der Zellisolierung zur Anwendung. Von Nachteil ist jedoch die geringe Substratspezifität von Trypsin, sodaß es in jedem beliebigen Protein, das die beiden Aminosäuren Lysin und Arginin nichtendständig enthält, hydrolytische Spaltungen katalysiert, also auch in Zellmembraneiweißen, wo es zu unerwünschten Zellalterationen führt.

Als später jedoch die Enzyme Hyaluronidase und Collagenase in ausreichender Menge und Reinheit zur Verfügung standen, wurde es möglich, zur Zellisolierung einen physiologischen Vorgang zu imitieren, der in vivo im Bindegewebe, z.B. bei Entzündungen, gleichartig abläuft.

Hyaluronidase, ein lysosomales Enzym, depolymerisiert die amorphe Grundsubstanz, wobei die linearpolymeren Glykosaminoglykane Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat A und C zu geradzahligen Oligosacchariden (Tetra- und Disaccharide) hydrolysiert werden, und setzt dadurch die argyrophilen Fibrillen dem direkten Angriff der Collagenase aus. Hierbei werden von den Fibrillen, die eine sich wiederholende 6-Aminosäuren-Sequenz aufweisen (an den Stellen 2 und 5 Prolin oder Hydroxyprolin, an Stellen 1 und 4 Glycin, Stellen 3 und 6 variabel), jeweils an der N-terminalen

Seite des Glycins Oligopeptide hydrolytisch abgespaltet. Durch das Zusammenwirken dieser beiden ausgesprochen substratspezifischen Enzyme wird das Bindegewebe aufgelöst, die Zellen verlieren ihren Zusammenhalt.

Die bald nach der Einführung dieser Zellisolierungsmethode beschriebenen Zellalterationen (blasige Ausstülpungen und Brüche der Plasmamembran, fehlende Respirationsaktivität, aufgetriebene Mitochondrien) scheinen nicht durch Nebenwirkungen der Enzyme entstanden, sondern durch die Anwendung oder Entwicklung eines unphysiologischen Milieus während des Isolierungsvorganges bedingt zu sein, da neuere morphologische und biochemische Untersuchungen (59, 98-102) an solcherart isolierten Hepatocyten eine unveränderte Ultrastruktur und erhaltene Synthesefähigkeiten feststellten, sobald bei geeigneter Konzentration der Enzymlösung auf physiologische Werte von Osmolarität, Ionenzusammensetzung und pH geachtet wurde.

Einen Überblick über die Möglichkeiten zur Zellisolierung, deren Vor- und Nachteile, bietet die Tabelle 4, ohne Anspruch auf Vollständigkeit zu erheben.

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, wirken bei der Anwendung von Hyaluronidase und Collagenase die geringsten schädigenden Einflüsse auf die Zellen ein. So darf besonders die erhaltene Fähigkeit dieser Einzelhepatocyten, Glukose aus Lactat oder Pyruvat zu synthetisieren (102), als ein zwingender Beweis der metabolischen Integrität gelten, da - wie KREBS et al. (112) ausführten - gerade dieser Prozeß eine intakte, ungestörte Arbeitseinheit zwischen Mitochondrien und Cytoplasma verlangt.

Noch unmittelbarer läßt sich die Unversehrtheit der Zellen an ihrer weiterhin bestehenden Fähigkeit zur Zellteilung demonstrieren. So wurden Mitoseraten von 0,4 % gefunden, wenn diese Zellen in Millipore-Kammern gefüllt in die Peritonealhöhle isolierter Ratten länger als 48 Std. eingepflanzt waren.

Die in der Tabelle 4 unter "Vitalität" angegebenen Prozentwerte stellen den Anteil der vitalen Zellen in der Schluß-

Prinzip	Agens	Vorzüge	Nachteile	Vitalität %
Mechanische Dispersion		keine metabolische Alteration der Zelle	äußerst geringe Ausbeute unzerstörter Zellen (102)	100
Ca ²⁺ -Komplexbildner mit anschließender mech. Dispersion	Na-TPB ebenso EDTA		intrazell. K ⁺ -Verlust (96) geringe Albumin- und Proteinsynthese (98) Chromosomenbrüche (102) 40% Verlust der Zellmasse (107) als Zeichen irrevers. Schädigung (108)	keine Angaben
	Citrat	intakte Protein-, RNA-Synthese; erhaltene Respiration (106) Kultivierbarkeit (104)	intrazell. K ⁺ -Verlust (96) 55% Verlust d. Zelltröckengewichts (105) geringe Albuminsynthese (98)	81 (104) 95 (106)
Hydrolysier. Enzyme	Trypsin (vor mech. Dispersion)	Kultivierbarkeit (109 -111)	intrazell. K ⁺ -Verlust (96) Zellmembranänderungen (105)	keine Angaben
	Hyaluronidase kombiniert mit Collagenase	unveränderte Zellmembran (105) unverändertes Antigenprofil (100) erhaltene Ultrastruktur (98) erhaltene Respirationsraten (59, 99, 101), Protein- und Albuminsynthese (98), Glycolyse und Gluconeogenese (102) Kultivierbarkeit (eigene Erg.)	intrazell. K ⁺ -Verlust (96)	43 - 80 (99) 75 - 95 (59) 90 (101) 90 - 95 (eig. Erg.)

Erklärungen: Na-TPB = Natrium-Tetraphenylborat
EDTA = Äthylendiamintetraessigsäure

Tab.4 : Vergleich der febrüchlichen Methoden zur Zellseparierung

präparation dar und sind weniger ein Kriterium für die Güte der eingeschlagenen Zellseparierung, sondern eher ein Maßstab für die Brauchbarkeit der anschließenden Isolierungsvorgänge und der dabei verwendeten Medien, wobei der ausreichenden und fortwährenden Sauerstoffversorgung der Hepatocyten während der Isolierungsschritte besonderer Wert zukommt.

Die in der vorliegenden Untersuchung für die Hepatocytenpräparation benutzten Zentrifugalbeschleunigungen von $20 \times g$ und $10 \times g$ für die Dauer von 15 min. bzw. 10 min. führten zu größerer Homogenität der Hepatocytenfraktion, insbesondere konnte so der Anteil der Nichtparenchymzellen auf weniger als 7 % gesenkt werden.

Wenngleich der Anteil der Zelltrümmer unmittelbar nach Ende der letzten Zentrifugation sehr gering war, so ließ es sich nicht vermeiden, daß sich dieser während der anschließenden Untersuchungsschritte vergrößerte und besonders bei der elektronischen Einzelzellvolumenbestimmung imponierte, da der zur Volumenmessung verwandte Puffer II frei von physikalisch gelösten Gasen sein mußte, also auch von Sauerstoff, weil sonst diese Gase bei dem Saugdruck von $0,1 \text{ kp/cm}^2$ dem Volumetriepuffer unter Blasenbildung entwichen wären, wobei diese Blasen ebenfalls Meßimpulse ausgelöst und so die Messung verfälscht hätten. Wegen der ausgeprägten Hypoxieempfindlichkeit der Hepatocyten (108, 111, 113) bedingte dieser Sauerstoffmangel jedoch den Vitalitätsverlust einiger Zellen, die dann während des Meßvorganges vom Kapillarsog zu Zellbruchstücken zerrissen wurden und diese Volumenfraktion vergrößerten.

Zur Volumetrie

Eine umfassende Beschreibung eines Körpers schließt neben der Angabe seiner Bestandteile auch deren morphometrische Charakterisierung ein. Diese im makroskopischen Bereich vergleichsweise leicht erfüllbare Forderung wirft auf mikroskopischem Niveau eine Fülle von Problemen auf.

Eine Abhilfe bietet die Stereologie als Lehre von der Deutung räumlicher Gebilde aus ihren Erscheinungsformen in niedrigeren Dimensionen. Nach dem allgemein gültigen Prinzip von DELESSE (123) kann auf eine - nicht selten auch undurchführbare - volumetrische Analyse verzichtet werden, weil die Bestimmung der Flächenanteile von Körpern in einem beliebigen Anschnitt grundsätzlich zum gleichen Ergebnis führt.

Da die mikroskopische Histologie jedoch nicht Anschnittflächen oder ideal dünne Schnitte, sondern mehr oder weniger dicke Präparate im durchscheinenden Licht beurteilt, werden die durchscheinenden Körper mit Ausnahme eines senkrecht zur Achse geschnittenen Zylinders oder Prismas systematisch überbewertet (HOLMES-Effekt).

Die ersten Korrekturansätze gehen auf HOLMES zurück; sie beziehen sich auf Anschnitte opaker Kugeln mit dem Durchmesser D in durchsichtiger Einbettung (120):

Die beim Schneiden eines Präparates, welches kugelförmige Partikel enthält, zufällig erzeugten Kugelschichten kann man sich zu vollständigen Kugeln zusammengesetzt denken. Daher genügt die Betrachtung einer einzigen, in Serie geschnittenen Kugel, um den HOLMES-Effekt zu demonstrieren.

In Abbildung 17 ist eine Kugel mit dem Radius R ($2R = D$) durch parallele Schnitte im Abstand T zerlegt. Die mittlere rechnerische Erwartung der Schnitzzahl n (im Beispiel: $n = 4,4$) wird von den beiden möglichen Mengen des Versuchs eingeschlossen (im Beispiel 4 oder 5).

Durch n solche Schnitte wird die Kugel in $n+1$ Abschnitte zerlegt, die bei der Flächenanalyse als umschriebene Zylinder mit Höhe T gewertet werden. n Zylinder sind über den variablen Schnittkreisen F errichtet, ihre mittlere Gesamthöhe beträgt $n \cdot T = D$. Bei gleichmäßiger "Rückung" um den Gesamtbetrag T werden alle Querschnitte der Kugel gleichmäßig erfaßt, das heißt

$$F_m = \frac{1}{6} \cdot D^2 \cdot \pi$$

und der mittlere Inhalt der n Ersatzzylinder identisch mit dem Kugelvolumen

$$V = \frac{\pi}{6} \cdot D^3$$

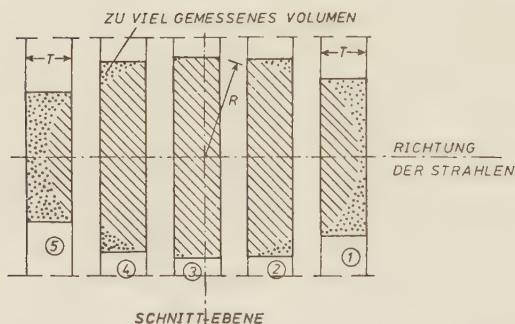


Abb. 17: Serienschnitte durch eine Kugel (aus (120)) und ihr scheinbares Volumen bei mikroskop. Betrachtung im durchscheinenden Licht.

Der übrig bleibende Zylinder (in Abb. 17 der dritte) ver-sinnbildlicht den Überschuß des mittleren scheinbaren Volumens V^+ . Er schließt den Kugelmittelpunkt ein und hat deshalb unabhängig von der Schnittlage stets den Inhalt $\frac{\pi}{4} D^2 \cdot T$. Daher wird $V^+ = V + \frac{\pi}{4} D^2 \cdot T$. Der Faktor k,

mit dem das Versuchsergebnis dividiert werden muß, ist also

$$k = \frac{V^+}{V} = 1 + \frac{\pi}{4} D^2 \cdot T \frac{6}{\pi \cdot D^3} = 1 + \frac{3 \cdot T}{2 \cdot D} = 1 + \frac{3 \cdot T}{4 \cdot R}$$

Die Tabelle 5 gibt die Abweichungen des realen Volumens V vom ermittelten scheinbaren Volumen V^+ für verschiedene Verhältnisse von Schnittdicke T zu Kugelradius R an, wie

sie sich aus der obigen Formel ergeben.

Schnittdicke T (L.E.)	Kugelradius R (L.E.)	Korrekturfaktor k	Realvolumen V (% V^+)
2,000	1,0	2,2500	40,0
1,000	1,0	1,7500	57,0
0,500	1,0	1,3750	73,0
0,200	1,0	1,1500	87,0
0,100	1,0	1,0750	93,0
0,050	1,0	1,0375	96,4
0,010	1,0	1,0075	99,3
0,005	1,0	1,0037	99,6

Tab. 5: Realvolumen V einer Kugel, ausgedrückt in Prozenten des stereologisch ermittelten, scheinbaren Volumens V^+ , für verschiedene Schnittdicken bei konstantem Kugelradius. (L.E. = Längeneinheiten)

Für Ellipsoide ist kein mathematisch exakter Korrekturansatz möglich. Man darf jedoch bis zu Achsenverhältnissen von 2 : 1 (große zur kleinen Achse) die bei Kugeln gültige Formel anwenden, wenn der für volumengleiche Kugeln entsprechende Radius R eingesetzt wird."

Neben der Korrektur des HOLMES-Effekts, welcher bei lichtmikroskopischen Volumenermittlungen zu beträchtlichen Überbewertungen führt, hat jede stereologische Methode in der Histologie neben der Verwendung von fixierten Geweben zusätzlich den Nachteil der Umständlichkeit und Langwierigkeit, was dazu führt, daß nur ein kleiner, zudem morphologisch alterierter Stichprobenumfang eine Grundgesamtheit mit entsprechender Unsicherheit repräsentieren kann.

Wie der Tabelle 5 zu entnehmen ist, sinkt der Einfluß des HOLMES-Effekts mit abnehmender Schnittdicke asymptotisch gegen Null, sodaß bereits bei einem Verhältnis der Schnittdicke zu Kugelradius von 1 : 20 die stereologisch bedingte Volumenüberbewertung von den Einflüssen der

methodisch bedingten Meßungenauigkeiten überlagert wird. Da diese Bedingungen bei elektronenoptischen Untersuchungen gegeben sind, können mit dieser Methode genauere Volumenbestimmungen durchgeführt werden, jedoch wirken sich auch hier der geringe Stichprobenumfang und die Gewebefixierung nachteilig auf die statistische Repräsentanz aus.

Eine Möglichkeit, den HOLMES-Effekt zu eliminieren, ohne die apparativ aufwendige Elektronenmikroskopie einsetzen zu müssen, ergibt sich, wenn statt der Zellschnitte ganze Zellen lichtmikroskopisch untersucht werden. Nach diesem Verfahren wurde von vitalen Einzelhepatocyten ($n \sim 5\,000$) ein mittleres Zellvolumen von $6840 (s \pm 1300) \mu^3$ mittels Durchmesserbestimmung errechnet.

Diese Angabe kann jedoch nicht als verläßlich gelten, da es erst durch eine nachträgliche Längeneichung möglich wurde, neben der ursprünglich beabsichtigten Aufstellung der Relativvolumenverteilungen von Einzelhepatocyten auch deren Absolutvolumina anzugeben. Zieht man in Betracht, daß ein 8,7 % zu groß gemessener Durchmesser bereits eine Volumenüberbewertung von 28 % bedeutet, so scheint es erlaubt, den Unterschied zu den anderen Werten der Tabelle 6 nicht einer methodischen Insuffizienz, sondern der nachträglichen Absoluteichung der mikroskopischen Präparataufnahmen zuzuschreiben.

Ein Verfahren, welches die Nachteile der stereologischen Methoden vermeidet, stellt die Volumenmessung mit Hilfe des modifizierten COULTER-Prinzips dar (s. II. Q. 2.).

Es erlaubt, die Zellvolumina eines beliebig großen Stichprobenumfanges mit hoher Geschwindigkeit direkt - also auch ohne histologische Fixierung - zu messen.

Nach diesem Verfahren wurde das mittlere Einzelhepatocytenvolumen aus etwa 144 000 vitalen Hepatocyten von weiblichen, unbehandelten, 102 ($s \pm 2,75$) g schweren BDE-Inzuchtratten bestimmt; es betrug $5353 (s \pm 1012) \mu^3$.

Dieser Wert stimmt sehr gut mit den in der Literatur angegebenen Werten überein (Tab. 6); die geringgradigen Abweichungen von den Literaturangaben sind in dem unterschied-

Autor	Methode	Geschlecht	Gewicht (g)	Schnittdicke (μ)	Volumen (μ^3)	HOLMES-Effekt beachtet
Weinbren, K. et al. (115)	li-mi	männl.	150-200	5	4580	+
Greenfard, Olga et al. (116)	li-mi		50	1	5600	+
Loud, A.V. (117)	li-mi	weibl.	287	1	6580	+
Moses, H.L. et al. (118)	li-mi	weibl.	5 Mon.	1	5400	+
Eigene Ergebnisse	li-mi	weibl.	100-150	1	8282	-
	Coulter	weibl.	102	Vitalzellen	6840	entfällt
Rohr, H.P. et al. (121)	el-mi	männl.	240	1	4940	+
Vergonet, G. et al. (122)	el-mi		adult	0,05	4700	unnötig
Weibel, E.R. (85)	el-mi	männl.	173,6	0,06 - 0,09	4940	unnötig

Erklärungen: li-mi = lichtmikroskopisch + = ausdrücklicher Hinweis in der Arbeit
 el-mi = elektronenmikroskopisch - = kein Hinweis in der Arbeit

Tab. 6 : Literaturvergleich zum Hepatocytenvolumen mit Hinweis auf die Bestimmungsmethode

lichen Alter, Geschlecht und Stamm der Ratten begründet.

Eine Erklärung für das von MOSES (118) angegebene extrem hohe Zellvolumen von $8282 (s \pm 989) \mu^3$ ist nicht möglich; weitere dort angegebene Volumenwerte weichen in ähnlicher Weise von denen anderer Autoren ab (s. Tab. 7). Obwohl MOSES (118) das Gesamtzellvolumen in Cytoplasma- und Nukleusvolumen spezifiziert, ergibt der Vergleich des Gesamtzellvolumens ($8282 \mu^3$) mit der Summe der beiden Teilvolumina ($6877,6 \mu^3$) eine nicht geklärte Differenz von $1404 \mu^3$.

Autor		Cytoplasma + Nukleus = Hepatocyt		
WEIBEL, E.R. et al.	(85)	4640 (94%)	300 (6%)	4940 (100%)
LOUD, A.V.	(117)	5100 (95%)	280 (5%)	5400 (100%)
MOSES, H.L. et al.	(118)	6292 (76%)	585 (7%)	8282 (83%)

Tab. 7: Literaturvergleich über Cytoplasma-, Nukleus- und Totalvolumen von Hepatocyten, ausgedrückt in μ^3 und % .

Zu den Volumenverteilungskurven

Da die stereologisch abgeleiteten Volumenverteilungskurven wegen ihres geringen Stichprobenumfanges und wegen der Indirektheit der Volumenbestimmung von jeher Schwierigkeiten bei der Charakterisierung der Verteilungskurven machten, hoffte man, diese Hindernisse durch die elektronische Volumenbestimmung mit herkömmlichen COULTER-Meßgeräten umgehen zu können. Man mußte aber erkennen, daß auch diese Methode zu Artefakten führen kann (s. II. Q. 2.). Es bedurfte z.B. intensiver Untersuchungen, um als Ursache der Rechtsschiefheit elektronisch bestimmter Volumenverteilungen normaler Humanerythrocyten, von denen auf Grund anderer Meßmethoden eine GAUSS-Verteilung gefunden worden war, die verschiedenen Kapillardurchtrittsbahnen der Erythrocyten verantwortlich machen zu können (78). Neben der Durchtrittsbahn der Partikel haben generell auch deren Größe, Form und Konsistenz Einfluß auf die Volumenbewertung (94).

Unter Beachtung dieser Faktoren (s. II. Q.) ergaben sich

für alle gemessenen Hepatocytenpräparationen GAUSS-Verteilungen.

Dieser Befund kann SCHRÖDERs Annahme von logarithmisch-normalen Verteilungen der Zellvolumen (124) nicht stützen. Eine mögliche Altersabhängigkeit des Volumenverteilungstyps, wie sie für Rattenleberkerne diskutiert wird (114), konnte durch die Bestimmung der Hepatocytenverteilung von Ratten verschiedenen Alters nicht bestätigt werden (Abb. 18). Daneben zeigte diese Untersuchung, daß es nicht möglich ist, ploidie- und kernzahlabhängige Zellvolumenuntergruppen zu separieren: Obwohl nach ausschließlicher Diploidie der Hepatocyten neugeborener Ratten mit steigendem Alter eine tiefgreifende Änderung des Ploidiegrades der Kerne und deren Anzahl je Zelle erfolgt (Tab. 8), führt diese Heterogenisierung der Kernpopulation zu keiner analogen Aufsplitterung in der Volumenverteilung (s. Abb. 18), die bei Bestehen eines konstanten organspezifischen Plasma-Kern-Volumenverhältnisses zu fordern gewesen wäre; vielmehr behielten die Volumenverteilungen neben ihrem GAUSS-Typ zusätzlich auch ihre Variationskonstante bei.

Kerne je Zelle	Ploidiegrad	Gesamtanteil (%)
1	2	10,4
	4	44,6
	8	13,4
2	2	21,9
	4	9,7

Tab. 8: Kernzahl und Ploidiegrad der Hepatocyten einer männlichen, 135 g schweren Wistar-Ratte (nach WIEST (126)).

Eine im Rahmen der Meßgenauigkeit gleichbleibende Variationskonstante der Hepatocytenverteilungen (18 - 19 %) wurde sowohl bei normalen, verschieden alten Ratten als auch bei solchen beobachtet, die einer Schein-"Teilhepat-

ektomie" oder 2/3-Leberresektion unterzogen worden waren.

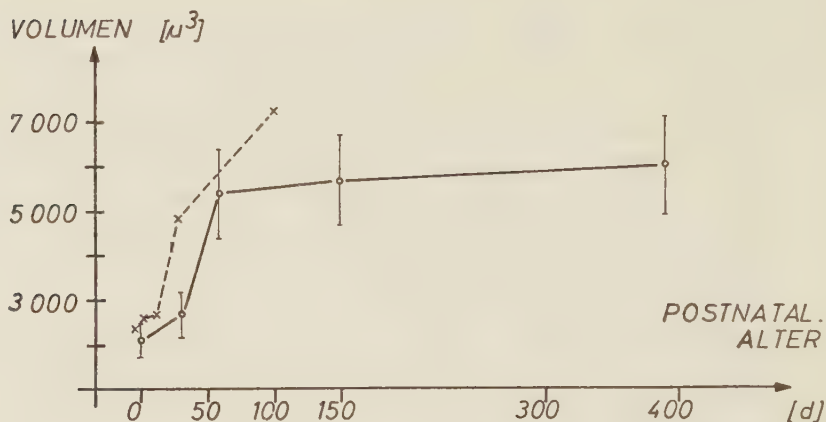


Abb. 18: Hepatocytenvolumen von Ratten verschiedenen Alters: Mittelwert und Standardabweichung s der jeweiligen Normalverteilung.

---x--- Werte nach GREENGARD (116)

Die Abweichungen beider Kurvenverläufe von einander sind vermutlich durch andere Bestimmungsmethoden und Tierstämme bedingt.

Die Schein-"Teilhepatektomie" führte bei der einzelnen Leberparenchymzelle zu einem Volumenanstieg von 18,7 % in den ersten 6 Std. p.o., obwohl diese Operation (s. II. L.) ihrem Wesen und ihrer Ausdehnung nach keine unmittelbare Reaktion der Leber erwarten lassen konnte, und übertraf zu diesem Zeitpunkt sogar den Volumenzuwachs der Hepatocyten nach Teilresektion um das Vierfache. Im weiteren postoperativen Verlauf reduzierte sich das Parenchymzellvolumen der scheinoperierten Tiere zwar wieder auf Normalwerte; jedoch sprechen die dabei auftretenden, unregelmäßigen Oszillationen für ein Fortbestehen der den Volumenparameter alterierenden Einflüsse, über deren Natur nur Vermutungen aufgestellt werden können (121), die sich aber von denen abheben, welche nach Teilhepatektomie zur Zellhypertrophie führen (s. unten: Zur Frage der Regenerationsregulation). Nach Teilhepat-

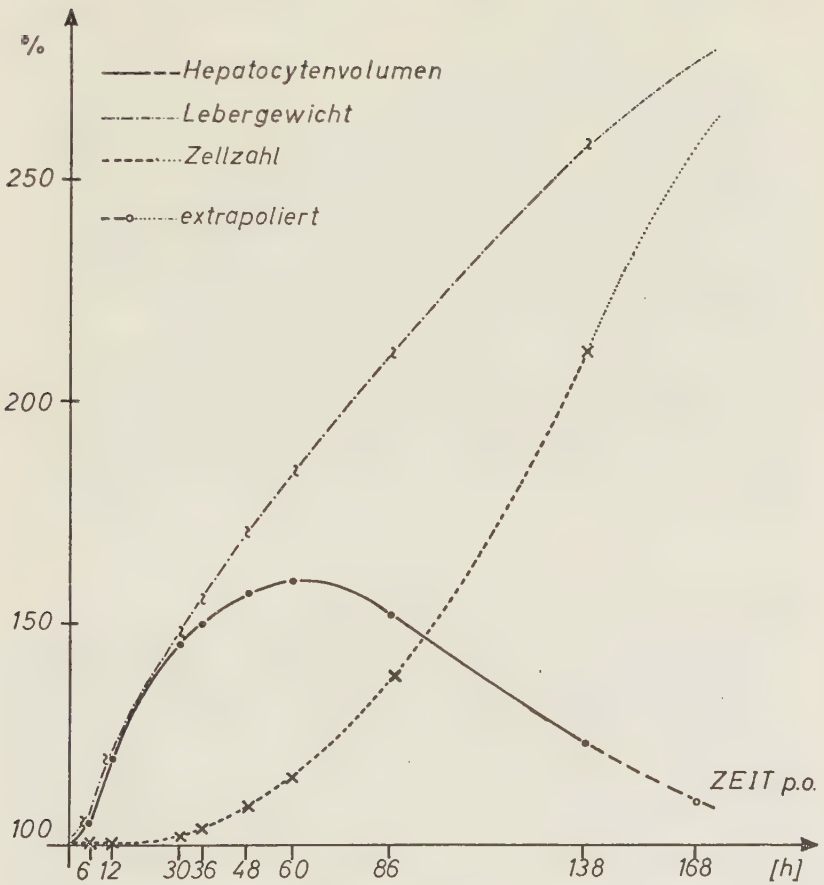


Abb. 19 : Relativwerte von Hepatocytenvolumen, Lebergewicht und Zellzahl nach Teilhepatektomie.
100 % entsprechen dem Zustand unmittelbar n a c h Operation.

ektomie kommt es zu einer ausgeprägten Hepatocytenhypertrophie, wobei der harmonische Verlauf eine Steuerung vermuten läßt, welche in Abhängigkeit zur aktuellen Parenchymmasse und zur Zellzahl steht (s. Abb. 19).

In den ersten 24 Std. p.o. ist der Anstieg des relativen Lebergewichts eine unmittelbare Folge des zunehmenden Hepatocytenvolumens. Im weiteren Verlauf schwächt sich die Zuwachsrates des Zellvolumens ab, ohne beim Lebergewicht eine gleiche Reaktion auszulösen, da die einsetzende Zellvermehrung eine Verlangsamung des Lebergewichtszuwachses verhindert; dieser Kompensationsvorgang gewinnt nach der 60. Std. p.o. besondere Bedeutung, da durch ihn eine Auswirkung des einsetzenden Zellvolumenrückganges auf die Leberwachstumsgeschwindigkeit vermieden wird.

Diesen geordneten Ablauf der Leberregeneration, die Interaktion zwischen initialer Hypertrophie und verzögerter Hyperplasie, meinte JOHNSON (53) mit der Theorie von der "kritischen Masse" (54), die erstmals zur Erklärung des Wachstums von Amöben aufgestellt wurde, erklären zu können.

Zur Hypothese von der "kritischen Masse"

In der Hypothese von der kritischen Masse wird behauptet, daß die DNA-Synthese und die anschließende Mitose einer Leberzelle ausgelöst werden, sobald sie bei ihrem Wachstum eine kritische Größe erreicht. Das bedeutet, daß die Regeneration primär über die Regulation des Cytoplasmawachstums gesteuert wird und der Hyperplasie eine sekundäre Rolle als notwendige Folge der Zellhypertrophie zukommt.

JOHNSON prüfte die Anwendbarkeit dieser Hypothese durch den Vergleich seiner eigenen experimentellen Daten mit solchen, die sich von dieser Theorie mittels einer Formel mathematisch ableiten lassen.

Zu dieser Formel führen 3 Annahmen:

1. Normale, intakte Hepatocyten haben eine GAUSSsche Volumenverteilung. - Die vorliegenden Ergebnisse be-

stätigen diese Annahme.

2. Die Geschwindigkeit des regenerativen Wachstums ist dem Organdefizit proportional. - Eingehende Untersuchungen haben diese Proportionalität für den regenerationsauslösenden Stimulus bestätigt (15, 64 - 67).
3. Die Zellteilung wird ausgelöst, wenn die Zelle ein "kritisches Volumen" erreicht hat. - Ob diese Annahme zutrifft, soll der Vergleich der Formelergebnisse mit experimentell gewonnenen Daten ergeben.

JOHNSONS Überlegungen: Durch die Bestimmung des Mitoseindex kennt man die Zahl der sich zur Zeit $t + \Delta t$ teilenden Zellen. Damit weiß man auch, wieviele Zellen zur Zeit t die "kritische Masse" erreicht und überschritten hatten, wobei Δt die Zeitspanne sei, die zwischen der Auslösung der Replikationsvorgänge und dem Auftreten der Mitose verstreicht. Da die Geschwindigkeit der Regeneration dem Organdefizit proportional ist (Annahme 2), beträgt die Hypertrophierate einer Zelle der Masse m_t zur Zeit t

$$\frac{dm_t}{dt} = k \left(\frac{m_o}{R} - m_t \right) \quad (I)$$

Hierbei seien m_o die Masse einer Zelle zur Zeit $t = 0$, d.h. zum Operationszeitpunkt, R der nach Operation verbleibende Organteil und k die Proportionalitätskonstante.

Somit würde $\frac{m_o}{R}$ dasjenige mittlere Einzelzellvolumen sein, welches die operationsbedingte Organverminderung bei Zellzahlkonstanz ausgleichen würde; die Abweichung des Einzelzellvolumens m_t zur Zeit t von diesem Kompensativvolumen betrage dann $\frac{m_o}{R} - m_t$.

Aus Gleichung (I) folgt:

$$m_t = m_o \left(\frac{1}{R} - \left(\frac{1}{R} - 1 \right) e^{-kt} \right)$$

Die relative Hypertrophie einer beliebigen Zelle zur Zeit t beträgt dann demnach

$$r_t = \frac{m_t}{m_o} = \frac{1}{R} - \left(\frac{1}{R} - 1 \right) e^{-kt} \quad (II)$$

Da jede Zelle um den Faktor r_t gewachsen ist, flacht sich die ursprüngliche GAUSS-Volumenverteilung um den Faktor $\frac{1}{r_t}$ ab.

Die Ausgangsverteilung lautete

$$f(m_o) = \frac{1}{s \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(m_o - \mu)^2}{2s^2}}$$

wobei s die Standardabweichung und μ der Mittelwert dieser Verteilung sein mögen.

Da $m_o = \frac{m_t}{r_t}$ ist, gilt zur Zeit t

$$f(m_o) = f\left(\frac{m_t}{r_t}\right) = \frac{1}{s \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{\left(\frac{m_t}{r_t} - \mu\right)^2}{2s^2}} \quad (III)$$

Wird diese Gleichung (III) umgeformt und dabei beachtet, daß jede Zelle, die die "kritische Masse" m_c überschreitet, nach Δt eine Mitose zeigt, so ergibt sich daraus der Mitoseindex MI.

$$MI_{t + \Delta t} = \frac{m_c \cdot k \cdot t_m}{r_t \cdot s \sqrt{2\pi}} \left(\frac{1}{R \cdot r_t} - 1 \right) \cdot e^{-\frac{\left(\frac{m_c}{r_t} - \mu\right)^2}{2s^2}}$$

(IV)

Es bedeuten:

$MI_{t + \Delta t}$	Mitoseindex des verbleibenden Organteils zur Zeit $t + \Delta t$
m_c	kritische Einzelzellmasse, bei der die replikativen Prozesse ausgelöst werden
k	Wachstumskonstante
r_t	relative Hypertrophie einer Zelle zur Zeit t
s	Standardabweichung der Zellvolumenverteilung zu Operationsbeginn

R	verbleibender Organteil nach Operation
μ	mittleres Einzelzellvolumen des intakten Organs
t_m	Mitosedauer

Um die Richtigkeit dieser Formel beweisen zu können, bestimmte JOHNSON die einzelnen Parameter experimentell an 1/2-teilhepatektomierten Mäusen. Da während der Regenerationszeit keine meßbare Änderung der spezifischen Dichte der Leberzellen erfolgt, sind Massenänderungen den Volumenänderungen proportional und somit ist es im weiteren Verlauf erlaubt, statt der Zellmasse das Zellvolumen zu betrachten:

$$\rho = M : V = \text{konstant}$$

$$M_1 : M_2 = V_1 : V_2$$

Dadurch war es JOHNSON möglich, aus den postoperativen, stereologisch gewonnenen Volumenverteilungen die relative Zellhypertrophie r_t und gemäß Formel (II) die Wachstumskonstante k zu ermitteln.

Diese betrug am 1. Tag p.o. 0,38 (Tag^{-1}), sank am 2. Tag auf 0,28 (Tag^{-1}) ab und hatte am 3. Tag p.o. den Wert von 0,29 (Tag^{-1}). Die Schwankungen dieser Konstante führte JOHNSON auf methodische Unzulänglichkeiten zurück; für die weiteren Rechnungen verwandte er $k = 0,3$ (Tag^{-1}) und nahm auf Literaturangaben hin die Mitosedauer t_m mit 1 Std. und die Zeit von beginnender Synthese bis Prophase, Δt , mit 8 Std. an.

Durch ^3H -Thymidin-Kernmarkierungen stellte JOHNSON autoradiographisch-stereologisch die Volumenverteilung der in der S-Phase befindlichen Hepatocyten fest, wobei die untere Volumengrenze als "kritisches Volumen" betrachtet wurde. Zur Bestimmung des Mitoseindex $MI_{t + \Delta t}$ wurden je Meßpunkt aus 10 000 Hepatocyten der prozentuale Mitoseanteil ermittelt.

In Abbildung 20 (aus (53)) vergleicht JOHNSON den experimentell bestimmten Mitoseindex mit dem nach Formel (IV) errechneten. Die bemerkenswerte Ähnlichkeit beider Ergeb-

nisse läßt die in mathematische Formeln gekleidete Hypothese von der "kritischen Masse" als zutreffend erscheinen.

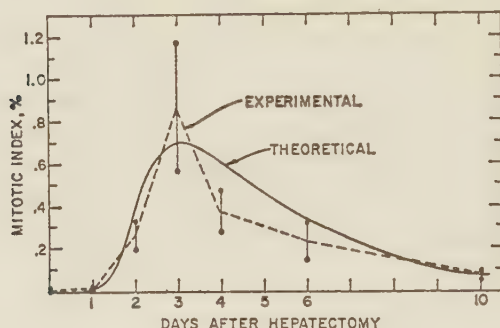
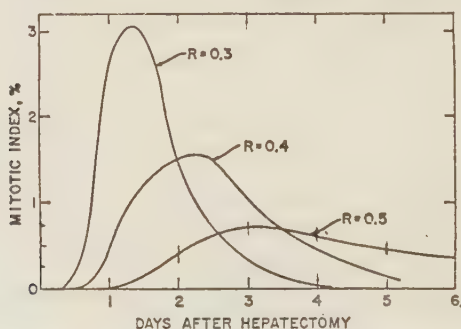


Abb. 20: Vergleich des experimentell bestimmten Mitoseindex mit dem nach Gleichung (IV).

(Aus (53))

Er bestärkt diese Annahme, indem er in Abb. 21 (aus (53), dort Text-Fig.6) zeigt, daß der experimentell erhobene Befund von der Proportionalität zwischen Organdefizit und Regenerationsgeschwindigkeit mit Gleichung (IV) ebenfalls richtig errechnet werden kann.



TEXT-FIG 6. The effect of varying R in Equation 7. The theory predicts a large variation in the pattern of mitotic response depending upon the amount of tissue remaining after partial hepatectomy. The more extensive the hepatectomy, the earlier and greater is the predicted proliferative response.

Abb. 21: Rechnerisch bestimmte Proportionalität zwischen

Organdefizit und Regenerationsgeschwindigkeit, die in Übereinstimmung zu experimentellen Untersuchungen (15, 64 - 67, 129) steht. (Equation 7 entspricht Gleichung (IV); aus (53))

Diese beiden "heuristischen Argumente" (53) für die Hypothese von der "kritischen Masse" sind jedoch falsch. Obwohl es das erklärte Ziel dieser Hypothese ist, die Regulation der Hyperplasie zu erklären, wird gerade die Folge der beobachteten oder errechneten Mitosen, nämlich die Zellvermehrung, unberücksichtigt gelassen. Die Konstante k der Gleichung (IV) wurde in Gleichung (II) bestimmt. Gleichung (II) beschreibt aber das Organwachstum als Folge der Volumenzunahme der einzelnen Zellen, wobei diese Einzelzellhypertrophie ihr Ende bei Erreichen der ursprünglichen, prä-operativen Organmasse findet. Nach Gleichung (II) würde jede Zelle um $1/R$, d.h. bei $1/2$ -Leberresektion um 100 % , bei $4/5$ -Teilhepatektomie um 400 % wachsen, um bei Zellzahlkonstanz das Organdefizit ausgleichen zu können. Vollends widersinnig erscheint es aber, mit diesen Gleichungen, in denen von einer post-operativen Zellzahlkonstanz ausgegangen wird, einen Parameter - die prozentuale Mitosehäufigkeit - auszurechnen, dessen unmittelbare Folge, nämlich die Erhöhung der Zellzahl, das gesamte Gleichungssystem ad absurdum führt. Daher können aus mathematischen Gründen JOHNSONS Gleichungen nur auf die initiale, zeitlich definierte Hypertrophiephase angewandt werden, und die von ihm gefundenen Übereinstimmungen zwischen errechneten und experimentell bestimmten Mitoseraten (s. Abb. 20, 21), die definitionsgemäß für die Zeiten der Hyperplasie gelten, lassen sich bestenfalls mit dem Zufall erklären. Gegen die Anwendbarkeit der Theorie von der "kritischen Masse" zur Erklärung der Proliferationsregulation in Geweben sprechen neben den mathematischen Einwänden, die gegen JOHNSONS Gleichungssystem vorzubringen sind, auch experimentelle Befunde.

Gemäß der Theorie werden in den Hepatocyten die Replikationsvorgänge regelmäßig bei Überschreiten eines "kritischen Zellvolumens" ausgelöst; dieser Zeitpunkt sei t . Bis diese Hepatocyten die ersten Anzeichen einer Mitose erkennen lassen, vergeht die Zeitspanne Δt . Sie umschließt die Synthesezeit S und die G_2 -Phase; ihre Dauer betrage 10 Stunden (75). Die sich zur Zeit $t + \Delta t$ teilenden Zellen wären dann identisch mit den Zellen, die zur Zeit t die größten in der Volumenverteilung waren, ihre prozentualen Anteile an den jeweiligen Populationen mithin gleich. Obgleich t eine Variable ist und die jeweiligen Prozentwerte im Verlauf der Regeneration schwanken, müßte bei der behaupteten Gesetzmäßigkeit immer ein konstanter Volumenwert diesen Prozentanteil in den variierenden Hepatocytenvolumenverteilungskurven markieren. Er wäre das "kritische Volumen".

Die Analyse (Tab. 9) der nach Teilhepatektomie aufgenommenen Hepatocytenvolumenverteilungen und Mitoseraten (s. Abb. 12, 16, 19) zeigt jedoch keinen auch nur annähernd konstanten Wert für ein "kritisches Volumen".

Zeit $t + \Delta t$	Mitoseindex	Grenzwert in Volumenverteilungen d. Zeit t
(h)	(%)	(μ^3)
12	0,02	9 000
30	5,70	9 400
36	2,40	10 500
48	3,50	10 900
60	0,40	12 700
86	0,20	13 100
138	0,03	11 300

Tab. 9: Errechnung eines Grenzwertes, der nach der Theorie vom "kritischen Volumen" diesem entspräche. Näheres s. Text.

Dieser Befund stellt allerdings nicht infrage, daß normalerweise die Teilungswahrscheinlichkeit für große Zel-

len wesentlich höher ist als für kleine, denn der Vergleich der nach der 60. Std. p.o. aufgenommenen Volumenverteilungskurven erfordert eine erheblich größere Teilungsaktivität der großvolumigen Zellen, da sonst deren späteres Fehlen nur mit dem Absterben dieser Zellen erklärt werden könnte, für das aber jeder Anhaltspunkt fehlt.

Die Unbrauchbarkeit der Theorie vom "kritischen Volumen" erweist sich auch bei dem Versuch, mit ihr den Befund zu erklären, daß gerade die Lebern junger, etwa 30 Tage alter Ratten, deren mittleres Hepatocytenvolumen etwa halb so groß ist wie das 150 Tage alter Tiere, einen deutlich höheren Basal-Mitoseindex haben als erwachsene Tiere.

Weiter hatten bereits 1936 BRUES et al. (97) im Hinblick auf die Vorgänge nach 2/3-Teilhepatektomie an leberteilresezierten Hungerratten festgestellt, daß der Nahrungsentzug zwar zu einer Abnahme des Zellvolumens führt, jedoch keinen Einfluß auf die operationsbedingte Zellzahl-erhöhung hat, daß also die im Normalfall zu beobachtende initiale Zellhypertrophie keine notwendige Voraussetzung für die Zellteilung ist.

Diesen Befund bestätigen WEINBREN et al. (115). Durch Ligatur des Portalvenenastes, der den rechten Leberlappen der Ratte versorgt, atrophierten die dort sitzenden Zellen, wobei deren mittleres Volumen in 6 Tagen von $4580 \mu^3$ auf $2450 \mu^3$ absank. 5 Tage nach Ligatur wurden der linke laterale und der vordere Leberlappen (etwa 2/3 des Gesamtorgans) entfernt; 29 Std. später erfolgte die Tötung der Tiere. Die stereologische Zellvolumenbestimmung an histologischen Leberpräparaten erbrachte für Hepatocyten, die sich im ligierten Lappen teilten, ein mittleres Volumen von $3510 (s \pm 430) \mu^3$; das Teilungsvolumen der Hepatocyten im unligierten Leberrest betrug $6500 (s \pm 610) \mu^3$. Somit konnte gezeigt werden, daß selbst solche Hepatocyten in die DNA-Synthese-Phase eintreten, deren mittleres Volumen um ein Viertel kleiner ist als das normaler, postmitotischer G_1 -Zellen.

Zur Regenerationsregulation

Die Beobachtungen von BRUES (97) und WEINBREN (115) legen nahe, für die Regulation der initialen Zellhypertrophie und der darauffolgenden Hyperplasie, die nach Teilhepatektomie zur Organrestitution führen, jeweils eigene, sich nicht bedingende Mechanismen anzunehmen.

Diese Vermutung wird gestützt durch die Beobachtungen über die Wirkung einer Reihe xenobiotischer Verbindungen. So lösen z.B. α -HCH (α -1, 2, 3, 4, 5, 6 - hexachlorocyclohexan) oder BHT (3, 5-di-(tert.)-butyl-4-hydroxytoluen) eine Lebervergrößerung mit Überwiegen der hyperplastischen Komponente aus; bei gleichzeitiger Gabe des Cytochrom-P₄₅₀-Inhibitors CFT 1201 (β -diäthylaminiäthylphenyldiallylacetat · HCl) kommt zwar die Proliferation zum Erliegen, die zu erwartende Verminderung des Leberzuwachses wird jedoch durch eine verstärkte Zellhypertrophie ausgeglichen (131). In ähnlicher Weise kann durch den DNA-Synthese-Blocker Azathioprine die nach Leberteilresektion auftretende Zellvermehrungsphase unterdrückt werden, ohne die Organregeneration zu beeinträchtigen, die nunmehr auf der Grundlage der Zellhypertrophie abläuft (132).

Untersuchungen über die **Beeinflußbarkeit des Leberwachstums** durch qualitative Variation des zufließenden Blutes brachten folgende Ergebnisse:

Wird nach einer hepatocellulär indifferenten heterotopen Autotransplantation von etwa 10 % der Leber ein portocavaler Shunt angelegt, so steigt das Gewicht des Transplantates um 83 %, ohne zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der DNA zu führen (Hypertrophie). Eine Teilresektion der nicht-transplantierten Leber erhöht das Transplantatgewicht um 89 %, den DNA-Gehalt um 58 % (Hyperplasie und Hypertrophie) (130).

Wird an einem eviscerierten, aber dennoch euglykämischen Tier eine Teilhepatektomie vorgenommen, so ist der DNA-Syntheseanstieg 3 mal höher als bei teilhepatektomierten Tieren mit erhaltenem Pfortaderzufluß (133).

Hinweise auf die Mediatoren, welche die Regulationsmecha-

nismen auslösen, geben die Untersuchungen von LEVI und ZEPPA (134). Die Autoren führten an in-situ isolierten Lebern Kreuzperfusionen durch. Hierbei beobachteten sie eine DNA-Stimulierung in Normallebern, sobald diese mit den Restlebern von Tieren gekoppelt waren, die mindestens 18 Std. vorher einer 2/3-Teilhepatektomie unterzogen worden waren. Diese Reaktion konnte auch ausgelöst werden, wenn das Perfusat einer Restleber - selbst nach Lagerung bei -70° oder nach 24 Std. Dialyse (4° , Porengröße 48 Å) - zur Perfusion einer Normalleber benutzt wurde. Keine Wirkung zeigte sich, wenn die Zeitspanne zwischen Teilresektion und Kreuzperfusion geringer war oder wenn unbehandelte Lebern verwandt wurden. Dieses Versuchsergebnis macht wahrscheinlich, daß die teilhepatektomierte Leber eine Substanz bildet und ins Perfusat abgibt, die - wiederum in der Leber - DNA-Synthese-stimulierend wirkt. Dieser hepatogen-hepatotrope Promotor ist spätestens nach 18 Stunden im Gefolge einer Teilhepatektomie nachweisbar, seine Wirkung scheint nicht expositionszeitabhängig.

Zusammenfassend lassen sich die angeführten Befunde deuten:

1. Das Volumen der Hepatocyten wird in enger zeitlicher Verknüpfung von der metabolischen Belastung gesteuert.
2. Ein hepatogen-hepatotroper Promotor bewirkt die Erhöhung der Zellzahl. Seine Bildung findet in der Präsynthesephase des Zellzyklus statt, in der bereits eine deutliche Zellhypertrophie besteht, deren Existenz jedoch keine Vorbedingung für seine Bildung ist. Obwohl der Verdacht wächst, daß eine Konzentrationserhöhung im Blut zirkulierender Verbindungen das replikationsauslösende Moment darstellen könnte - hierbei sei besonders an LIEBERMANs Befund von der DNA-stimulierenden Wirkung eines Gemisches aus L-Trijodthyronin, Aminosäuren, Glucagon und Heparin auf Hepatocyten erinnert (135) - , so bleiben doch die Reaktionspartner und ihre Reaktionsweise bei der Synthese dieses Promotors weiterhin ungeklärt.

Zu den in Kammern implantierten Hepatocyten

Die in Millipore-Kammern eingeschlossenen Hepatocyten - ähnlich einem homologen Heterotransplantat - wurden in die Peritonealhöhle teilhepatektomierter (TH-Zellen) oder schein-"teilhepatektomierter" Ratten (Kontrollzellen) gebracht; während der Implantation siedelten sie sich an den Innenseiten der Kammermembranen an und bildeten dort Einzellschichten.

Um die Wirkung humoraler, teilhepatektomiebedingter Faktoren zu untersuchen, wurden die Proliferationsaktivität und das Volumen dieser Zellen bestimmt. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen TH-Zellen und Kontrollzellen gefunden werden.

Der deutliche Volumenrückgang (s. III. D. 4., 5.; Abb. 13, 14) beider Zellarten auf etwa ein Drittel ihrer Ausgangsgröße ist gleich den von WEINBREN (115) beschriebenen Atrophieerscheinungen portaler Zuflüsse entzogener Zellen; er scheint - gemäß der Ausführungen im vorigen Abschnitt - vom Mangel metabolischer Belastung bedingt. Dieses Zellvolumen entspricht dem fötaler Hepatocyten (s. Abb. 18; (116)). Wegen der Identität der Volumina von Kammerzellen und Fötalhepatocyten und der Ähnlichkeit ihrer metabolischen Situation scheint diese Zellgröße das spezifische Mindestvolumen von Rattenhepatocyten zu sein.

Wie die Zellgröße blieb auch die Proliferation der Kammerzellen unbeeinflusst von der Behandlung der Wirtstiere (s. III. F. 4., 5.; Abb. 16). Nach der Proliferationsruhe in den ersten 30 Stunden stieg die Teilungsaktivität sowohl der TH-Zellen als auch der Kontrollzellen rasch auf einen Plateauwert von 0,4 % an. Die Wirkung eines humoralen, nach Teilhepatektomie auftretenden Faktors auf die Kammerzellen muß also verneint werden. Dieser Befund schließt jedoch nicht seine Existenz aus; vielmehr kann aus der vorläufigen Beschreibung des hepatogen-hepatotropen Promotors (134) auf eine Unfähigkeit geschlossen werden, das Gefäßsystem durch Diffusion zu verlassen. Dies würde sein Fehlen in der Peritonealhöhle erklären.

Ungeklärt bleibt der Mechanismus, der in den Kammerzellen eine im Vergleich zur Normalleber 20fache Erhöhung der Mitoserate auslöst. Möglicherweise ist auch hierbei der hepatogen-hepatotrope Promotor beteiligt, der von den Kammerzellen gebildet wird, die - nachdem sie von der humoralen Gesamtsteuerung durch Diffusionsschranken abgeschnitten sind - nunmehr einer autonomen Regulation unterstehen.

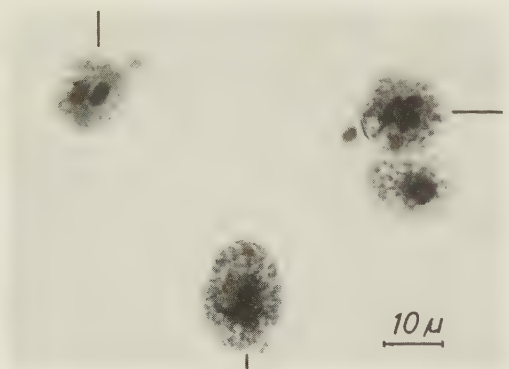


Abb. 22: Kammerzellen nach 60 Stunden Implantation in der Bauchhöhle einer schein-"teilhepatektomierten" Ratte. Die Pfeile deuten auf Mitosen.

V. Zusammenfassung

1. Es wird eine enzymatische Präparationsmethode zur Gewinnung von Hepatocyten beschrieben. In der Endpräparation sind 90 - 95 % der Zellen vital; der Anteil der Nichtparenchymzellen beträgt 7 %.
2. Der spezifische Oberflächenwiderstand der Hepatocyten ist bei 4° größer als 9,8 und kleiner als 14,6 k Ω cm.
3. Hepatocyten sind elastisch verformbar. Sie werden in einer Kapillare von 200 μ Durchmesser und bei einem Saugdruck von 0,1 kp/cm² während des Kapillardurchlaufs zu Ellipsoiden verformt.
4. Es wird eine elektronische Methode nach dem COULTER-Prinzip zur raschen Bestimmung von Hepatocytenvolumenverteilungen eines großen Stichprobenumfanges beschrieben, welche den stereologischen Verfahren wegen der Verwendung vitaler Zellen, des sehr viel größeren Stichprobenumfanges und der Möglichkeit zur automatischen Datenauswertung wesentlich überlegen ist.
5. Die Volumina der Einzelhepatocyten sind GAUSS-verteilt. Das mittlere Volumen der Leberparenchymzellen von weiblichen, 100 g schweren, unbehandelten BDE-Inzuchtratten beträgt $5353 (s \pm 1012) \mu^3$.
6. Das mittlere Hepatocytenvolumen steigt mit dem Lebensalter.
7. Die Variationskonstanten der Leberzellvolumenverteilungen normaler, schein-"teilhepatektomierter" oder teilhepatektomierter Ratten sind nahezu identisch.
8. Das zur Erklärung der Regenerationsregulation der Leber nach Teilhepatektomie von JOHNSON aufgestellte Gleichungssystem zur Theorie vom "kritischen Volumen" ist mathematisch fehlerhaft.

9. Auch eine Vielzahl experimenteller Befunde widerspricht der Annahme eines "kritischen Volumens".
10. Der Regenerationsprozess wird im Normalfall von einer initialen Hypertrophie und einer anschließenden Hyperplasie der Zellen getragen.
Beide Prozesse können unabhängig von einander ablaufen.
Die vermeintliche Abhängigkeit, wie sie in der Theorie vom "kritischen Volumen" zum Ausdruck kommt, leitet sich von der stochastischen Interpretation der zeitlichen Verläufe beider Prozesse ab.
11. Die Hypertrophie der Hepatocyten wird sehr wahrscheinlich von der metabolischen Belastung gesteuert.
12. Der als Hyperplasie-auslösend diskutierte hepatogen-hepatotrope Promotor ist in der Peritonealflüssigkeit nicht nachweisbar.
13. Werden Einzelhepatocyten in Diffusionskammern intraperitoneal isologen, schein-"teilhepatektomierten" oder teilhepatektomierten Ratten implantiert, so sinkt beidesmal deren Volumen auf ein Drittel ab, ohne daß ihre Vitalität oder Proliferationsfähigkeit eingeschränkt oder unterschiedlich stark ausgeprägt sind.
Diese Größe entspricht der fötaler Hepatocyten, deren metabolische Situation der der Kammerzellen gleicht; dieses Volumen scheint das spezifische Hepatocytenvolumen der Ratte zu sein. Es beträgt $1716 (s \pm 308) \mu^3$.

VI. Literaturverzeichnis

1. Lüscher, M. In: Handbuch d. allg. Pathol., Bd. VI/1, S. 405. Springer-Verl., Berlin-Heidelberg-New York (1955)
2. Wohlfarth-Bottermann, K.E. In: Probleme d. biol. Reduplikation, Hrsg. P. Sitte, S. 289. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1966)
3. Wehrmeyer, W. In: Probleme d. biol. Reduplikation, Hrsg. P. Sitte, S. 203. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1966)
4. Diers, L. In: Probleme d. biol. Reduplikation, Hrsg. P. Sitte, S. 227. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg-New York (1966)
5. Goss, R.J. Adaptive growth. Logos Press. Acad. Press., London (1964)
6. Rössle, R. Wachstum und Altern. Eigenverlag, München (1923)
7. Simpson, G.E.C., E.S. Finckh J. Path. Bact., 86, 361 (1963)
8. Fisher, B., Patricia Szuch et al. Cancer Res., 31, 322 (1971)
9. Romeis, B. Mikrosk. Technik, 16. Auflage, Oldenbourg-Verlag, München-Wien (1968)
10. Podwyssozki, W.v. Beitr. path. Anat., 1, 259 (1886)
11. Ponfick, E. Virchows Arch. path. Anat., 118, 209 (1889)
12. Meister, V.v. Beitr. path. Anat., 15, 1 (1894)
13. Mall, F.P. Amer. J. Anat., 5, 227 (1906)
14. Rous, P., D.L. Larimore J. exp. Med., 31, 609 (1920)
15. Bucher, N.L.R. Int. Rev. Cytol., 15, 245 (1963)
16. Bucher, N.L.R. New Engl. J. Med., 277, 686 (1967)
17. Gentile, J.M., L. Avila et al. Amer. J. Surg., 120, 2 (1970)
18. Mann, F.C. Surgery, 8, 225 (1940)
19. Leong, G.F., Rita L. Pessotti et al. Amer. J. Physiol., 197, 880 (1959)

20. Higgins, G.M., R.M. Anderson Arch. Path., 14,
42 (1932)
21. Glinos, A.D., G.O. Gey Proc. Soc. exp. Biol.
(N.Y.), 80, 421 (1952)
22. Glinos, A.D. In: The chemical basis of develop-
ment, ed. W.D. McElroy and B. Glass, p. 813.
John Hopkins Press, Baltimore (1958)
23. Glinos, A.D. In: Liver function, ed. R.W. Brauer.
Amer. Inst. Biol. Sci., Publ. No. 4, Washing-
ton (1958)
24. Hemingway, J.T. Nature, 191, 706 (1961)
25. Roberts, S., A. White J. biol. Chem., 180, 505
(1949)
26. Alivisatos, S.G.A., K. Stern et al. Proc. Soc.
exp. Biol. (N.Y.), 103, 465 (1960)
27. Benacerraf, B., D. Bilbey et al. J. Physiol., 136,
287 (1957)
28. Weinbren, K., E. Tarsh Brit. J. exp. Path., 45,
475 (1964)
29. Fisher, B., C. Russ et al. Arch. Surg., 69,
263 (1954)
30. Lieberman, I., P. Kane et al. J. biol. Chem.,
240, 3140 (1965)
31. Bullough, W.S. Biol. Rev., 37, 307 (1962)
32. Adibi, S., K.E. Paschkis et al. Exp. Cell Res.,
18, 396 (1959)
33. Lancker, J.L. van, H.L. Borison BBA (Amst.),
51, 171 (1961)
34. Sakai, A. Nature, 228, 1186 (1970)
35. Christensen, B.G., E. Jakobsen Acta med. scand.
Suppl., 234, 103 (1949)
36. Wenneker, A.S., N. Sussmann Proc. Soc. exp. Biol.
(N.Y.), 76, 683 (1951)
37. Islami, A.H. Surg. Gynec. Obstet., 108, 549 (1959)
38. Lancker, J.L. van, D.G. Sempoux Arch. Biochem.,
80, 337 (1959)

39. Wrba, H., H. Rabes et al. Exp. Cell Res., 46,
263 (1967)
40. Rabes, H. In: Untersuchungen zur humoralen Regulation bei regenerativem und malignem Wachstum. Veröffentl. aus d. morph. Pathol., Heft 73, S. 99. Fischer-Verlag, Stuttgart (1967)
41. Bronk, B.V., G.J. Dienes Biophysical J., 10,
487 (1970)
42. Moolten, F.L., N.L.R. Bucher Science, 158, 272
(1967)
43. Friedrich-Freksha, H., F.G. Zaki Z. Naturforsch.,
9b, 394 (1954)
44. Stich, H., M.L. Florian Canad. J. Biochem., 36,
855 (1958)
45. Riley, P.A. Nature, 223, 1382 (1969)
46. Virolainen, M. In: Control of cellular growth in adult organisms, ed. Teir, H., H. Rytömaa, p. 232. Acad. Press, London (1967)
47. Weiss, P. Science, 115, 287 (1952)
48. Weiss, P. In: Biol. specificity and growth, ed. Butler, E.G., p. 195. Princeton Univ. Press, Princeton (1955)
49. Weiss, P., J.L. Kavanau J. gen. Physiol., 41, 1
(1957)
50. Bullough, W.S., E.B. Laurence In: Control of cellular growth in adult organisms, ed. Teir, H., H. Rytömaa, p. 28. Acad. Press, London (1967)
51. Pool, B. Advanc. Morphogenes., 5, 93 (1966)
52. Scaife, J.E. Experientia, 26, 1071 (1970)
53. Johnson, H.A. Amer. J. Path., 57, 1 (1969)
54. Mazia, D. Amer. Sci., 44, 1 (1956)
55. Tumanishvili, G.D. J. Embryol. Exp. Morphol.,
20, 53 (1968)
56. Hanks, J.H., R.E. Wallace Proc. Soc. exp. Biol. Med., 71, 196 (1949)

57. Wallhäüßer, K.-H. Pharm. Ind., 32, 247 (1970)
58. Peters, Renate Z. Naturf., 17b, 164 und 169 (1962)
59. Howard, R.B., L.A. Pösch J. biol. Chem., 243,
3105 (1968)
60. Bessis, H. In: Ciba Foundation Symposium in
Cellular Injury, ed. Reuck, A.V.S. de, J.
Knight, p. 287. Churchill, London (1964)
61. Sajkiewicz, K., B. Bausdorf Histochemie, 18,
267 (1969)
62. Amos, D.B. In: Transplantations of tissues and
cells, ed. Billingham, R.E., W.K. Silvers,
p. 69. Wistar Inst. Press, Philadelphia (1961)
63. Higgins, G.M., R.M. Anderson Arch. Path., 12,
186 (1931)
64. Heine, W.D., E. Stöcker Klin. Wschr., 46, 395
(1968)
65. Mac Donald, R.E., A.E. Rogers et al. Lab. Invest.,
11, 544 (1962)
66. Drabkin, D.L. J. biol. Chem., 171, 395 (1947)
67. Stöcker, E. Verh. dtsch. Ges. Path., 50, 53 (1966)
68. Günther, G., K. Hübner et al. Virchows Arch. Abt.
B. Zellpath., 1, 69 (1968)
69. Grundmann, E. In: Handbuch d. allg. Path., Bd.
III/3. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-
New York (1969)
70. Klinge, O., J. Mathyl Virchows Arch. Abt. B.
Zellpath., 2, 154 (1969)
71. Russo, J., J.M. Echave-Llanos Z. Zellforsch.,
61, 824 (1964)
72. Hurley, J. Biophysical J., 10, 74 (1970)
73. Rabes, H., H.V. Tuzcek Virchows Arch. Abt. B.
Zellpath., 6, 302 (1970)
74. Grisham, J.W. Cancer Res., 22, 842 (1962)
75. Fabrikant, J.I. J. Cell Biol., 36, 551 (1968)
76. Coulter, W.H. U.S. Patent 26 56 508 (1953)

77. Gutmann, J., G. Hofmann et al. In: Standardisation in Haematology III, ed. C.G. de Boroviczeny, p. 42. Karger-Verlag, Basel-New York (1966)
78. Kachel, V., H. Metzger et al. Z. ges. exp. Med., 153, 331 (1970)
79. Thom, R. Coulter Symposium, Bad Nenndorf (1968)
80. Thom, R., A. Hampe et al. Z. ges. exp. Med., 151, 331 (1969)
81. Westerman, G. J. Lab. clin. Med., 57, 819 (1961)
82. Bull, B.S. Blood, 31, 503 (1968)
83. Coulter Electronics Ltd. Medical and Biological Bibliography, Dunstable (1969)
84. Schulte-Hermann, R., R. Thom et al. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. u. exp. Path., 261, 42 (1968)
85. Weibel, E.R., W. Stäubli et al. J. Cell Biol., 42, 68 (1969)
86. Fricke, H. Phys. Rev., 24, 575 (1924)
87. Velick, S., M. Gorin J. Gen. Physiol., 23, 753 (1940)
88. Grover, N.B., J. Naaman et al. Biophys. J., 9, 1398 (1969)
89. Grover, N.B., J. Naaman et al. Biophys. J., 9, 1415 (1969)
90. Kachel, V. Dissertation TU Berlin (1972)
91. Grover, N.B., M. Bloch et al. Growth, 34, 145 (1970)
92. Gutmann, J. Elektromedizin, 11, 62 (1966)
93. Metzger, H., G. Valet et al. Blut, 25, 179 (1972)
94. Metzger, H., V. Kachel et al. Blut, 23, 143 (1971)
95. Tsuboi, K.K., H.O. Yokoyama et al. Arch. Biochem., 48, 275 (1964)
96. Murthy, Lalitha, H.G. Petering Proc. Soc. exp. Biol. Med., 132, 931 (1969)
97. Brues, A.M., D.R. Drury et al. Arch. Path., 22, 658 (1936)

98. Weigand, K., M. Müller et al. Exptl. Cell Res., 67, 27 (1971)
99. Lentz, P.E., N.R. Di Luzio Exptl. Cell Res., 67, 17 (1971)
100. Iype, P.T., R.W. Baldwin et al. Br. J. Cancer, 26, 6 (1972)
101. Cantrell, E., E. Bresnick J. Cell Biol., 52, 316 (1972)
102. Berry, M.N., D.S. Friend J. Cell Biol., 43, 506 (1969)
103. Cohn, N.S. Exptl. Cell Res., 24, 596 (1961)
104. Ap Gwynn, I., B.M. Jones et al. Cytobios, 2, 181 (1970)
105. Thimmappayya, B., R.R. Reddy et al. Exptl. Cell Res., 63, 333 (1970)
106. Bhargava, P.M. In: Ciba Foundation Symposium, ed. Wolstenholme, G.E.W., p. 158. Churchill, London (1969)
107. Rossini, Mara, T. Tongiani Experientia, 27, 685 (1971)
108. Campbell, A.K., C.N. Hales Exptl. Cell Res., 68, 33 (1971)
109. Hays, D.M., I. Tedo et al. J. Surg. Res., 9, 133 (1969)
110. Hays, D.M., Y. Hirai et al. J. Surg. Res., 11, 590 (1971)
111. Neupert, G. Acta histochemica, 38, 149 (1970)
112. Hems, R., B.D. Ross et al. Biochem. J., 101, 284 (1966)
113. Stevens, K.M. Nature, 206, 199 (1965)
114. Valet, G., H. Metzger et al. In Vorbereitung
115. Weinbren, K., G.A. Stirling et al. Br. J. exp. Path., 52, 583 (1971)
116. Greengard, Olga, Micheline Federman et al. J. Cell Biol., 52, 261 (1972)
117. Loud, A.V. J. Cell Biol., 37, 27 (1968)
118. Moses, H.L., J.A. Stein et al. Lab. Invest., 22, 432 (1970)

119. Hennig, A In: Quantitative Methoden in der Morphologie, Hrsg. Weibel, E.R., H. Elias, S. 99. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1967)
120. Hennig, A. Mikroskopie, 25, 154 (1969)
121. Rohr, H.P., J. Strebel et al. Beitr. Path., 141, 52 (1970)
122. Vergonet, G., F.A. Hommes et al. Biol. Neonate, 16, 297 (1970)
123. Delesse, M.A. Ann. mines, 13, 379 (1848)
124. Schröder, R. Acta histochem., 30, 297 (1968)
125. Kubitschek, H.E. J. theor. Biol., 28, 15 (1970)
126. Wiest, Lucia Experientia, 25, 848 (1969)
127. Grundmann, E., H.J. Seidel In: Handbuch d. allg. Path., Bd VI/2, S. 129. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1969)
128. Stöcker, E., E. Teubner et al. Verh. dtsch. Ges. Path., 48, 295 (1964)
129. Straube, R.L., H.M. Patt Federation Proc., 20, 286 (1961)
130. Sigel, B., L.B. Baldia et al. Surg. Gynec. Obstet., 125, 95 (1967)
131. Schulte-Hermann, R., I. Schlicht et al. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 273, 109 (1972)
132. Malamud, D., E.M. Gonzales et al. Cancer Res., 32, 1226 (1972)
133. Max, M.H., J.B. Price et al. J. Surg. Res., 12, 120 (1972)
134. Levi, J.U., R. Zeppa Ann. Surg., 174, 364 (1971)
135. Lieberman, I., J. Short J. Invest. Dermat., 59, 17 (1972)

Mein Dank gilt Frau Dr. G. Hanser, Frau Ring und
Fräulein Eberhard für die Anfertigung der histo-
logischen Präparate.

Den Herren Dr. G. Valet, Dr.-Ing. V. Kachel,
Dr. H. Metzger und Dipl.-Phys. R. Trebin danke
ich für die wertvollen Diskussionen zu dieser
Arbeit.

Lebenslauf

1944	7. März geboren in Frohburg/Sa.
1950 - 1958	Besuch der Grundschule Frohburg
1958 - 1963	Besuch der Klenze-Oberrealschule München
1963 - 1965	Besuch der Oberrealschule Kempten/Allgäu
1965	Abitur
1965 - 1971	Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1972	Medizinisches Staatsexamen
1969 - 1971	Doktorand am Max-Planck-Institut für Biochemie in München
Seit 1972	Stipendiat am Max-Planck-Institut für Biochemie in München

